



Departamento de Farmacología y Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

Alteración en la Expresión Vascular de
iNOS y COX-2 con la Hipertensión.
Papel del sistema renina angiotensina y
del estrés oxidativo

TESIS DOCTORAL

Yolanda Álvarez Muñoz

2006



Departamento de Farmacología y Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

Mercedes Salaices Sánchez, Catedrática del Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y, **María Jesús Alonso Gordo**, Profesora Contratado Doctor del Departamento de Ciencias de la Salud de la Facultad de Ciencias de la Salud III de la Universidad Rey Juan Carlos,

CERTIFICAN:

Que Dña. **Yolanda Álvarez Muñoz**, ha realizado bajo su dirección el trabajo “**Alteración en la expresión vascular de iNOS y COX-2 con la hipertensión. Papel del sistema renina angiotensina y del estrés oxidativo**” con objeto de obtener el Grado de Doctor.

Y para que conste, expedimos el presente certificado en Madrid a 12 de Mayo de 2006.

Dra. Mercedes Salaices Sánchez Dra. María Jesús Alonso Gordo

Este trabajo ha sido financiado con ayudas de la Universidad Autónoma de Madrid, DGICYT (SAF2003-0633), de la Red Temática de Enfermedades Cardiovasculares (RECAVA, FISS C03/01) y FISS (PI041917)

“El verdadero precio de todas las cosas, lo que todas las cosas cuestan realmente al hombre que quiere adquirirlas es el esfuerzo y la molestia que supone adquirirlas.”

Adam Smith

“Caminante no hay camino, se hace camino al andar.”

Antonio Machado

A Paula.

*Por los inolvidables
momentos que me regalaste.*

AGRADECIMIENTOS

Todos los que pasamos por esta experiencia expresamos lo difícil que es escribir esta parte de nuestra Tesis Doctoral; probablemente sea cierto, pero empezar a hacerlo, significa que la realización de este trabajo llega a su culminación y, agradecer a multitud de personas el que me hayan ayudado, hayan contribuido y hayan confiado en mí para llevar a cabo este proyecto me llena de satisfacción. Casi cinco años han sido necesarios para moldear esta Tesis de la que me siento realmente orgullosa porque me ha servido para madurar profesional y personalmente; ha sido realmente una experiencia intensa, que he aprovechado y que me alegro haberla podido llevar a cabo. Sin embargo, todo este trabajo, a lo largo de todo este tiempo, no hubiera sido posible sin mis directoras de Tesis, mis compañeros, mi familia y mis amigos.

Quiero agradecer en primer lugar a la Dra. Mercedes Salaices y a la Dra. María Jesús Alonso, con las que ha sido un auténtico placer trabajar; me han ayudado, dirigido y enseñado a dar mis primeros pasos en el mundo de la Ciencia. Sin su orientación, sin sus consejos, sin su sosiego y tranquilidad en los momentos complicados, y sin su pasión por este trabajo, no se hubiera podido finalizar este proyecto. Muchas gracias por haber confiado en mí.

Agradezco al Dr. Antonio García, director del Dpto. de Farmacología y Terapéutica de la Universidad Autónoma de Madrid cuando me incorporé, y al actual director, el Dr. Jesús Frias por permitirme realizar mi trabajo en el Departamento.

Gracias a la Dra. Gloria Balfagón y Dra. Mercedes Ferrer, del Departamento de Fisiología de la UAM, por su ayuda desinteresada

cuando la he necesitado, sus buenos consejos y su implicación en este trabajo. También quiero agradecer a las Dras. Silvia Arribas y Mari Carmen González, del Departamento de Fisiología de la UAM, por su cordialidad y amabilidad cuando he necesitado su ayuda.

Llega el momento de agradecer, muy especialmente, a todas y todos mis compañeros que he tenido y tengo en el laboratorio; todos ellos, sin excepción, me han ayudado y han contribuido tanto en el desarrollo de mi trabajo, que unas líneas no serán suficientes para agradecerse. Quiero agradecerle a Silvia Tovar por la que siento un gran afecto; su paso por el laboratorio hizo que me incorporara yo un tiempo después que ella, me ayudó en mis primeros momentos y me enseñó los truquillos del laboratorio. En la actualidad, Ana Briones, Raquel, Amada, Annuski, Mayte y Marta, son las personas con las que comparto laboratorio, cafés, comida, y muchas, agradables y largas tertulias, que van a hacer que el paso por el laboratorio no lo olvide jamás. No me olvido de Vicente, nuestro único fichaje masculino, y de Ángela, mis compañeros de la URJC. Además no quiero dejar de agradecer a Raquel y a Vicente, por sus horas de trabajo que me han prestado y a Ana Briones por las horas dedicadas a enseñarme. También quiero acordarme de Fabiano, que aparte de los buenos consejos informáticos y experimentales que me dio, su año y medio de estancia en el laboratorio, sirvió para que forjáramos una buena amistad, que espero perdure por mucho tiempo. A todos quiero daros las gracias por vuestra ayuda experimental y técnica con las que he aprendido muchísimo, y sobre todo por los buenos momentos que hemos pasado juntos. No quiero olvidarme de otras personas que pasaron por el laboratorio como María, Elena, Gema, Patricia y, en especial, a Natalia por su ayuda con las ratitas, y de las nuevas

incorporaciones brasileñas Ale y Giulia, con las que estoy segura, aprenderé mucho.

Gracias también a mis chicos de los laboratorios C13 y C14, de Fisiología, en especial a Javi, Rosa e Iván, que con sus alegres idas y venidas por el L-4 nos amenizan las mañanas. Gracias también por vuestra colaboración y ayuda prestada en todo momento.

También quiero agradecer a todos los compañeros de los laboratorios del Dpto. de Farmacología que pasaron por aquí, y a los que permanecen aún aquí, en especial a las chicas del L-2, Luisa, Ana, Rocío y Eva, por su simpatía, amabilidad y disponibilidad en cualquier momento.

Quiero agradecer a la Dra M^a del Carmen Fernández Criado sus servicios prestados en el animalario de la Facultad de Medicina de la UAM, y a todos los que allí trabajan, en especial a Manolo, Santi y David, por las charlas y risas tempraneras cuando iba a buscar los animales a primera hora del día, y por supuesto, por cuidar tan bien esos animalillos blancos que he utilizado en mi trabajo.

Aparte de todas las personas con las que he convivido durante mi estancia en la Facultad de Medicina, no puedo olvidarme de mis amigos ajenos a este mundo y que son los que me han ayudado a desconectar de los experimentos, muy recomendable a veces. Gracias a mis chicas de Biología, Ángela, Beatriz, Cristina, Paloma y Yolanda, que habéis hecho que mi estancia en Madrid, una ciudad ajena a mí, fuera mucho más agradable y divertida. Por esas salidas de cañas por Latina que hemos tenido, y por las que espero que tengamos. Quiero agradecer a mis amigas de Segovia, Encar, Helia, M^a Luisa, Rosa, Laura, Yoli y Amparo, por todos los ánimos recibidos de ellas en todo

este tiempo, y por ser, en definitiva, unas amigas estupendas. Muchas gracias a todos mis amigos de Cogeces, por esos buenos momentos que pasamos juntos y por mostrar tanto interés en esas ratitas con hipertensión y en mi trabajo. No quiero olvidarme de mis amigas de Chatún, mi pueblo, y en especial de Noelia, Elena y Montse, con las que he pasado momentos fascinantes a lo largo de mi vida y con las que espero volver a pasarlos. A todos muchas gracias por estar a mi lado.

Quiero agradecerle, especialmente, a toda mi familia con los que, indudablemente, he pasado los mejores momentos de mi vida; a mis padres, Paco y María, y a mis hermanos, Eduardo, Kico, Henar, Mari y Asun por su apoyo incondicional en todo momento, sus buenos consejos y por ayudarme a llegar hasta aquí. Gracias también a M^a Carmen, a M^a José, a Raúl y a Santi, que participan activamente en los buenos momentos familiares y que me han ayudado siempre en lo que he necesitado. Y gracias, sobre todo, a mis sobrinos Sergio, Daniel, Arturo, Ricardo, Susana, Rubén, Hugo, Luca y Gabriela, porque ellos hacen que nada sea aburrido. Gracias a todos por dejarme disfrutar de vosotros.

Y gracias a Álvaro por comprender lo que esta Tesis suponía para mí y por los esperados momentos que compartiremos juntos.

Índice

	Pág
-Resumen.....	7
-Abreviaturas.....	11
-Introducción.....	17
1. Factores que regulan el tono vascular.....	20
1.1. Óxido Nítrico.....	23
1.2. Prostanoides.....	29
1.3. Sistema Renina-Angiotensina.....	34
1.3.1. Mecanismos de señalización de la angiotensina II...	38
1.4. Especies reactivas de oxígeno.....	43
1.4.1. $O_2^{\cdot-}$	44
1.4.2. H_2O_2	47
1.4.3. $OH^{\cdot-}$	48
1.4.4. $ONOO^-$	49
1.5. Otros factores.....	50
2. Alteraciones vasculares con la hipertensión.....	51
2.1. Alteraciones en la vía del NO.....	53
2.2. Alteraciones en la vía de la COX.....	55
2.3. Alteraciones en el sistema renina-angiotensina.....	57
2.4. Alteraciones en el estado oxidativo.....	61
3. La hipertensión como enfermedad inflamatoria.....	64
-Objetivos.....	69
-Materiales y métodos.....	73
1. Grupos de animales y tratamientos.....	76
2. Reactividad vascular.....	76
3. Expresión de proteínas por Western Blot.....	80
4. Inmunofluorescencia.....	83
5. Expresión de ARNm por PCR-RT.....	85
6. Cuantificación de la producción de prostaglandina $F_{2\alpha}$, Prostaciclina y 8-isoprostano por enzimoimmunoensayo.....	86

7. Cuantificación de la producción de anión superóxido.....	88
7.1. Quimioluminiscencia producida por lucigenina.....	88
7.2. Fluorescencia producida por la oxidación del dihidroetidio.....	88
8. Medida de malondialdehído en plasma.....	89
9. Determinación del estado antioxidante total en plasma.....	90
10. Determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno en plasma...	90
11. Expresión de los datos y estadística.....	91
12. Fármacos y soluciones.....	92
-Resultados.....	95
1. Respuestas vasculares a fenilefrina y acetilcolina.....	97
1.1. Papel del endotelio en la respuesta a fenilefrina.....	98
2. Participación del NO sintetizado por iNOS en la respuesta a fenilefrina.....	99
2.1. Expresión de iNOS.....	105
3. Participación de O_2^- y H_2O_2 en la respuesta a fenilefrina.....	107
3.1 Enzimas generadoras de O_2^-	112
4. Participación de prostanoïdes sintetizados por COX-2 en la respuesta a fenilefrina.....	115
4.1. Expresión de COX-2.....	119
4.2.1. Expresión de COX-2 por PCR-RT cuantitativa.....	119
4.2.2. Expresión de COX-2 por Western blot.....	120
4.2.3. Expresión de COX-2 por Inmunofluorescencia.....	121
4.2. Papel de prostanoïdes sintetizados en el endotelio en la respuesta a fenilefrina.....	124
4.3. Papel de prostanoïdes sintetizados en la adventicia en la respuesta a fenilefrina.....	113
4.4. Cuantificación de la liberación de eicosanoïdes en el medio de incubación de segmentos de ratas normotensas e hipertensas.....	125
5. Papel del sistema renina angiotensina en la producción vascular de derivados de COX-2.....	127
5.1. Efecto del losartán sobre la presión arterial.....	130

5.2. Efecto del losartán sobre las respuestas vasculares a fenilefrina y acetilcolina.....	130
5.3. Efecto del losartán sobre la participación de prostanoïdes contráctiles derivados de COX-2 en la respuesta a fenilefrina.....	132
5.4. Efecto del losartán sobre la expresión vascular de COX-2....	136
5.4.1. Expresión de COX-2 por PCR-RT cuantitativa.....	136
5.4.2. Expresión de COX-2 por Western blot.....	137
5.5. Efecto del losartán sobre la liberación de PGF _{2a} y 8-isoprostano.....	139
5.6. Efecto del losartán sobre la producción de O ₂ ⁻ , la producción de malondialdehído y el estado antioxidante total.....	141
6. Papel de los aniones superóxido en la producción vascular de derivados de COX-2.....	143
6.1. Efecto del tempol sobre la presión arterial.....	143
6.2. Efecto del tempol sobre las respuestas vasculares a fenilefrina y acetilcolina.....	144
6.3. Efecto del tempol sobre la participación de prostanoïdes contráctiles derivados de COX-2 en la respuesta a fenilefrina.....	145
6.4. Efecto del tempol sobre la expresión vascular de COX-2.....	149
6.4.1. Expresión de COX-2 por PCR-RT cuantitativa.....	149
6.4.2. Expresión de COX-2 por Western blot.....	150
6.5. Efecto del tempol sobre la liberación de PGF _{2a} y 8-isoprostano.....	152
6.6. Efecto del tempol sobre la producción de malondialdehído y el estado antioxidante total.....	154
6.7. Efecto del tempol sobre la producción de H ₂ O ₂ plasmático.....	155
-Discusión.....	157
1. Participación del NO sintetizado por iNOS en la respuesta a fenilefrina.....	162
2. Participación de O ₂ ⁻ y de H ₂ O ₂ en la respuesta a fenilefrina.....	164
3. Participación de prostanoïdes sintetizados por COX-2 en la respuesta a fenilefrina.....	168

<i>4. Papel del sistema renina-angiotensina en la producción vascular de derivados de COX-2.....</i>	175
<i>6. Papel de los aniones superóxido en la producción vascular de derivados de COX-2.....</i>	181
-Conclusiones.....	187
-Bibliografía.....	191

Resumen

La hipertensión se ha definido en los últimos años como una enfermedad de naturaleza inflamatoria. Se han descrito incrementados niveles de citoquinas proinflamatorias, de moléculas de adhesión celular, así como de enzimas inducibles como iNOS y COX-2 en diferentes modelos de hipertensión animal y humana. La angiotensina II, el péptido vasoactivo del sistema renina-angiotensina, podría estar mediando esta respuesta inflamatoria a través de la estimulación de la producción de especies reactivas de oxígeno, principalmente por la NAD(P)H oxidasa. Los derivados de enzimas como iNOS y COX-2, así como el aumento del estrés oxidativo observado con la hipertensión, pueden contribuir a alteraciones del tono vascular observados con esta patología.

En este estudio hemos analizamos en primer lugar si los productos de iNOS, COX-2 y especies reactivas de oxígeno participaban en la respuesta vasoconstrictora inducida por fenilefrina, un agonista $\alpha 1$ -adrenérgico, y si dicha participación estaba alterada con la hipertensión. La participación de prostanoïdes contráctiles endoteliales derivados de COX-2 se incrementó con la hipertensión, debido a un aumento en la expresión de dicha enzima y en la liberación de sus derivados. Por otro lado, la expresión de iNOS en aorta de ratas hipertensas también se incrementó; sin embargo, la participación del óxido nítrico derivado de iNOS en las respuestas contráctiles, no se vio alterada debido, probablemente, a la eliminación de éste por la mayor producción de anión superóxido observada con la hipertensión.

Debido al importante papel que juegan la angiotensina II y las especies reactivas de oxígeno en la patología de la hipertensión, nuestro siguiente objetivo fue analizar si la angiotensina II y el anión superóxido estaban implicados en la mayor participación de prostanoïdes contráctiles derivados de COX-2 observada con la hipertensión en la contracción inducida por fenilefrina. El tratamiento de los animales con el antagonista del receptor AT_1 de la angiotensina II, losartán, disminuyó la mayor participación de prostanoïdes contráctiles derivados de COX-2, la expresión de COX-2 y la liberación de los derivados de esta enzima, así como el estrés oxidativo que estaba aumentado en ratas hipertensas. Por otra parte,

Resumen

el tratamiento realizado con el análogo de la superóxido dismutasa, tempol, disminuyó la participación de prostanoïdes contráctiles derivados de COX-2 en las respuestas vasculares de animales hipertensos, sin afectar a la expresión de la enzima.

En conclusión, la expresión vascular de enzimas inducibles durante la hipertensión puede alterar las respuestas vasoconstrictora; la angiotensina II y los aniones superóxido pueden estar implicados en esa alteración. Estos resultados aportan nuevos datos sobre las alteraciones que se observan con la hipertensión y los mecanismos implicados en las mismas.

Abreviaturas

1400W: N-[3-(aminometil) bencil] acetamidina, dihidrocloruro

7NI: 7-nitro indazol

AA: ácido araquidónico

AC: adenilato ciclasa

ACh: acetilcolina

ADNc: adenosín desoxiribonucleico complementario

AG: aminoguanidina

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

Ang: angiotensina

AP-1: activador de la proteína 1

APS: persulfato amónico

ARNm: adenosín ribonucleótido mensajero

AT₁: receptor de la angiotensina, subtipo 1

AT₂: receptor de la angiotensina, subtipo 2

AT₄: receptor de la angiotensina, subtipo 4

bFGF: factor de crecimiento de fibroblastos básico

BH₄: tetrahidrobiopterina

CaM: calmodulina

COX: ciclooxigenasa

CRE: Elemento de respuesta de AMPc

CTGF: factor de crecimiento de tejido conectivo

dABC: diferencias de área bajo la curva

DAG: diacilglicerol

DP: receptor de PGD₂

ECA: enzima convertidora de angiotensina

EDHF: factor hiperpolarizante derivado de endotelio

EGF: factor de crecimiento epidérmico

eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial

Abreviaturas

EP: receptor de PGE_2
ES: error estándar
ET: endotelina
FAD: flavín adenosín dinucleótido
FAK: quinasas de adhesión focal
FMN: flavín adenosín mononucleótido
FP: receptor de $\text{PGF}_{2\alpha}$
GCs: Guanilato ciclasa soluble
GMPc: guanosín monofosfato cíclico
GTP: guanosín trifosfato
 H_2O_2 : peróxido de hidrógeno
 IC_{50} : concentración inhibitoria del 50%
ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1
IGF-1: factor de crecimiento similar a insulina 1
IL: interleuquina
INF γ : interferón- γ
iNOS: óxido nítrico sintasa inducible
IP: receptor de PGI_2
IP $_3$: inositol 1,4,5-trifosfato
 $\text{I}\kappa\text{B}$: proteína inhibitoria del factor nuclear κB
IRAP: aminopeptidasa regulada por insulina
KH: Krebs-Henseleit
L-NAME: L-N^G-nitroarginina metil éster
LPS: lipopolisacárido
MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos
MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1
MDA: malondialdehído
MLC $_{20}$: cadena ligera de la miosina

MLCK: quinasa de la cadena ligera de la miosina
NAD(P)H: nicotinamida adenín dinucleótido fosfato, forma reducida
NADH: nicotín adenín dinucleótido
NF- κ B: factor nuclear de transcripción κ B
nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal
NO: óxido nítrico
NS 398: N-(2-ciclohexiloxi-4-nitrofenil) metanosulfonamida
 $O_2^{\cdot-}$: anión superóxido
ONOO $^-$: peroxinitrito
PAD: presión arterial diastólica
PAF: factor activador de plaquetas
PAI-1: inhibidor del activador de plasminógeno-1
PAS: presión arterial sistólica
PBS: tampón fosfato
PCR-RT: reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas
PG: prostaglandina
PI3K: proteína fosfatidilinositol-3-quinasa
PIP $_2$: fosfatidil inositol 4,5-bifosfato
PKA: proteína quinasa dependiente de AMPc
PKC: proteína quinasa C
PKG: proteína quinasa dependiente de GMPc
PLA $_2$: fosfolipasa A $_2$
PLC: fosfolipasa C
PTP: proteínas tirosín fosfatasas
PPAR: receptor activador de la proliferación de peroxisomas
RANTES: quimiocina regulada sobre activación, célula T normal expresada y secretada

Abreviaturas

ROS: especies reactivas de oxígeno

RS: retículo sarcoplasmático

SDS: dodecil sulfato sódico

SERCA: ATPasa de retículo sarcoplasmático

SHR: rata espontáneamente hipertensa

SHRSP: SHR “Stroke Prone”

SNO: S-nitrosotioles

SOD: superóxido dismutasa

SQ 29,548: ácido [1S-[1a, 2a (z), 3a, 4a]]-7-[3-[[2-[(Phenylamino) carbonil]hidrazino] metil]-7-oxabicyclo [2.2.1] hept-2-il]-5 heptanoico

SRA: sistema renina angiotensina

STAT: activador de la transcripción y de la señal de transducción

TAS: estado antioxidante total

TGF- β : factor de crecimiento transformante- β

TNF- α : factor de necrosis tumoral α

TP: receptor de TXA₂

TXA₂: tromboxano A₂

UTR: región sin transcribir

VCAM-1: molécula de adhesión de célula vascular 1

VEGF: factor de crecimiento de células endoteliales vasculares

WKY: rata Wistar Kyoto

Introducción

La hipertensión arterial representa uno de los principales problemas de salud a nivel mundial. El estudio y control adecuado de la misma podría llevar a una reducción sustancial de la enfermedad cardiovascular, cerebrovascular y renal, que en la actualidad son la primera causa de mortalidad en los países industrializados. El entendimiento de su fisiopatología conduce a un adecuado tratamiento, reduciendo de esta manera el daño de los órganos diana y la mortalidad a largo plazo.

La hipertensión se caracteriza por un incremento en la resistencia vascular periférica que va a desencadenar el incremento en la presión arterial; además, durante esta patología se desarrollan alteraciones funcionales y estructurales de las que hablaremos a lo largo de esta introducción. En los últimos años se le ha dado una gran relevancia al proceso inflamatorio crónico que se ha observado con la hipertensión, con la presencia de linfocitos y macrófagos activados, cuyos efectos pueden alterar el equilibrio existente entre los factores que regulan y mantienen la presión arterial. El sistema renina angiotensina y el estrés oxidativo han sido implicados en el desarrollo de este proceso inflamatorio. En esta introducción se hablará de los diferentes factores implicados en la regulación del tono vascular, así como de las alteraciones observadas con la hipertensión y los factores implicados en dichas alteraciones.

1. Factores que regulan el tono vascular

El principal determinante de la contractilidad del músculo liso vascular es el nivel de Ca^{2+} libre intracelular. Tanto la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular, como su salida desde los depósitos intracelulares promueven el aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$).

Diversos son los mecanismos que originan este aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Así, la activación de receptores acoplados a proteínas G por agonistas de naturaleza contráctil, promueve la activación de la fosfolipasa C (PLC) que genera diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) a partir de fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PIP_2). El DAG estimula la proteína quinasa C (PKC), mientras que el IP_3 promueve la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático (RS) por activación del receptor- IP_3 de la membrana del retículo. Por otra parte, los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje que se activan por depolarización de la membrana, así como los canales de Ca^{2+} acoplados a receptores, también van a contribuir al incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Horowitz y cols., 1996). Cuando los niveles de Ca^{2+} intracelular aumentan, se produce un acoplamiento del mismo a la calmodulina (CaM); el complejo Ca^{2+} -CaM se une a la enzima quinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), que se encuentra en forma inactiva, formando un complejo enzimático que cataliza la transferencia de grupos fosfato a la cadena ligera de la miosina (MLC_{20}), incrementando así la actividad ATPasa de la miosina y la contracción muscular (Gao y cols., 2001) (Fig. 1).

La activación de proteínas G acopladas a receptores, no sólo estimula la PLC, sino que también puede activar la fosfolipasa A_2

(PLA₂) y la biosíntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico (AA); además, puede activar Rho-quinasas y cascadas de proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK-Ras). La PKC, Rho-quinasa y MAPK pueden fosforilar directamente la MLC₂₀, incrementando la actividad ATPasa de la miosina. Además el AA, la PKC y la Rho-quinasa inhiben a la enzima miosina fosfatasa, manteniendo de esa forma la fosforilación de la MLC₂₀ (Abdel-Latif, 2001) (Fig. 1).

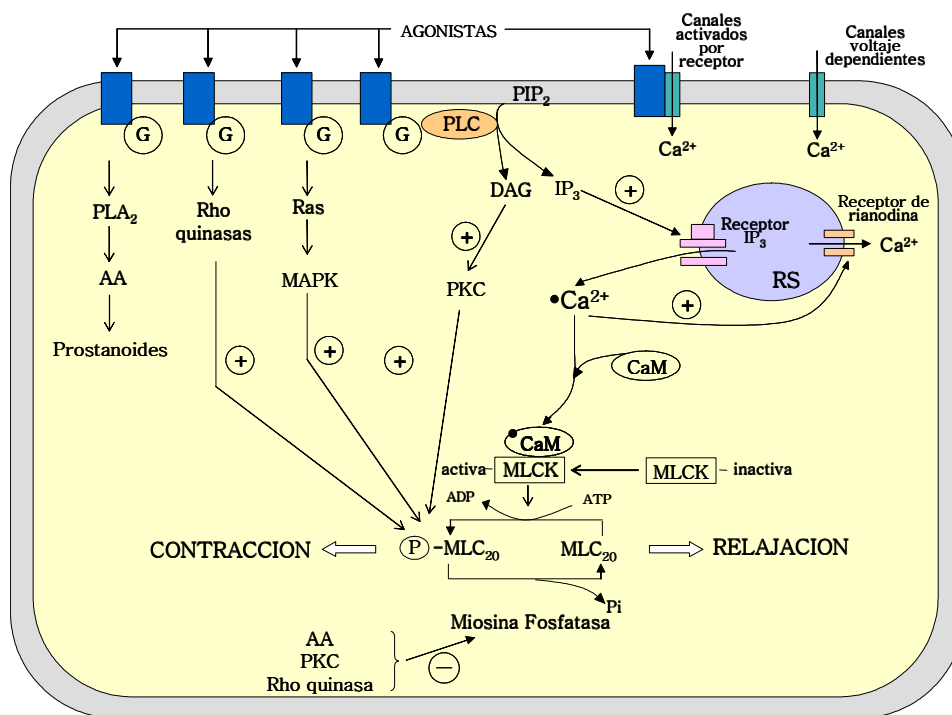


Fig. 1: Mecanismos intracelulares implicados en la contracción muscular. AA: ácido araquidónico, CaM: calmodulina, DAG: diacilglicerol, IP₃: inositol 1,4,5-trifosfato, MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos, MLC₂₀: cadena ligera de la miosina, MLCK: quinasa de la cadena ligera de la miosina, PIP₂: fosfatidil inositol 4,5-bifosfato, PLA₂: fosfolipasa A₂, PLC: fosfolipasa C, PKC: proteína quinasa C, RS: retículo sarcoplásmico. (Adaptado de Abdel-Latif, 2001).

La relajación del músculo liso se produce como resultado de la eliminación del estímulo contráctil, o por la acción directa de sustancias que estimulan la inhibición de los mecanismos contráctiles. Los procesos de relajación requieren la disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ y el incremento de la actividad miosina fosfatasa (Webb, 2003). Múltiples compuestos van a generar segundos mensajeros intracelulares que promueven el inicio de una cascada de señalización molecular para producir relajación. Los nucleótidos cíclicos como adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y guanosín monofosfato cíclico (GMPc), a través de la activación de las proteínas quinasa dependiente de AMPc (PKA) y quinasa dependiente de GMPc (PKG), respectivamente, son los mensajeros que promueven la relajación del músculo. La activación de PKA y PKG promueve la activación de proteínas que inhiben la Ca,Mg-ATPasa del retículo sarcoplasmático, activan la Ca,Mg-ATPasa del sarcolema o inhiben canales de Ca^{2+} , participando así en la recaptación del Ca^{2+} hacia el retículo y la salida del Ca^{2+} a través de la membrana plasmática y disminuyendo, por tanto, la $[Ca^{2+}]_i$. Además, la activación de PKA puede inhibir a la PKC disminuyendo la síntesis de IP_3 y de DAG (Bomzon y Huang, 2001). El AMPc es el principal mediador de la relajación inducida por agonistas β -adrenérgicos, mientras que el GMPc media la relajación inducida por óxido nítrico y péptido natriurético auricular entre otros (Carvajal y cols., 2000).

El tono vascular está regulado por factores vasodilatadores y vasoconstrictores liberados, en gran parte, por el endotelio vascular y por la propia célula muscular lisa en respuesta a estímulos químicos o mecánicos. Algunos de esos factores como el óxido nítrico, los

prostanoides o los radicales libres, los veremos más en detalle a continuación.

1.1. Óxido Nítrico

El óxido nítrico (NO) es un gas que difunde fácilmente a través de las membranas celulares y que posee potentes acciones vasodilatadoras. La NO sintasa (NOS) es la enzima encargada de sintetizar NO y L-citrulina a partir de L-arginina (L-Arg) y O_2 (Fig. 2). Durante esta síntesis, el grupo guanidino terminal de la L-Arg se oxigena dando lugar a un compuesto intermedio, N^G-hidroxi-L-arginina (L-OH⁻ Arg). En la siguiente reacción, el enlace C=N de la L-OH-Arg se oxida, formándose NO y L-citrulina. En ambos pasos se consumen O_2 y nicotinamida adenín dinucleótido fosfato (NADPH) y se requieren flavín adenín dinucleótido (FAD), flavín adenín mononucleótido (FMN), tetrahidrobiopterina (BH_4) y calmodulina como cofactores (Marín y Rodríguez-Martínez, 1997).

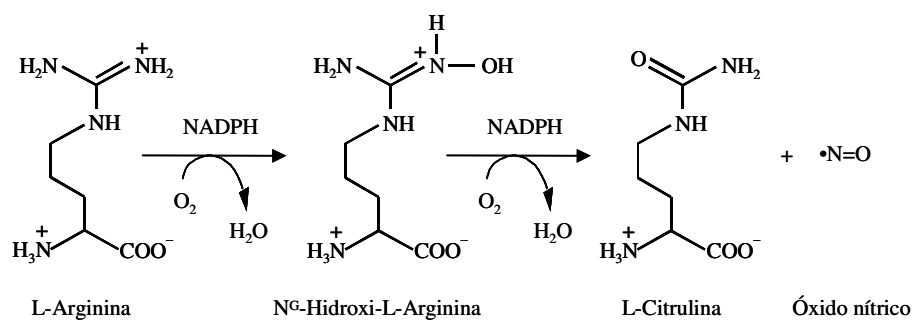


Fig. 2: Reacción de síntesis del óxido nítrico.

La NOS es funcional cuando se encuentra en forma de dímero; cada una de las subunidades contiene un dominio reductasa C-terminal y un dominio oxigenasa N-terminal. El dominio con actividad

inducible (iNOS) se puede expresar en macrófagos, células endoteliales, neutrófilos o células musculares lisas durante estados de inflamación o después de ser estimuladas con moléculas como el lipopolisacárido bacteriano (LPS) o citoquinas como la interleuquina (IL) 1 β . Su actividad, al contrario que la de las isoformas constitutivas, es independiente de la concentración de Ca²⁺ intracelular. La iNOS es capaz de producir grandes cantidades de NO (Nathan, 1997), y dependiendo de las concentraciones de L-Arg, va a poder sintetizar NO, anión superóxido (O₂⁻) o incluso ambos (Andrew y Mayer, 1999). A su vez, la interacción entre NO y O₂⁻ forma peroxinitrito (ONOO⁻) (Stoclet y cols., 1999). También eNOS y nNOS, en ausencia de L-Arg o del cofactor BH₄, son capaces de sintetizar O₂⁻ y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Andrew y Mayer, 1999). Cada una de las isoformas de la NOS es codificada por un gen diferente; así los genes de nNOS, iNOS y eNOS se localizan en los cromosomas 12, 17 y 7, respectivamente (Marín y Rodríguez-Martínez, 1997), y su estructura genómica es similar (Alderton y cols., 2001). La regulación de las distintas isoformas de NOS es diferente; así, la isoforma inducible se regula a nivel transcripcional y post-transcripcional, mientras que las isoformas constitutivas se van a regular a nivel post-transduccional mediante la unión a diversas proteínas y por señales de fosforilación (Papapetropoulos y cols., 1999).

En condiciones fisiológicas, la producción de NO en las células endoteliales se estimula por una variedad de agonistas y por las fuerzas de rozamiento producido por el flujo sanguíneo. El NO así producido está implicado en la regulación del tono vascular y la resistencia periférica, contribuyendo, de este modo, al control de la presión arterial. El NO también interviene en la modulación de la

contractilidad cardíaca, tiene propiedades vasoprotectoras y antiateroscleróticas, inhibe la agregación plaquetaria y la adhesión a la pared vascular, y previene la liberación del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) que estimula la proliferación de las células musculares lisas (Marín y Rodríguez-Martínez, 1997; Li y Förstermann, 2000).

La vida media del NO es del orden de segundos; por ese motivo el NO ejerce su acción sobre células cercanas al lugar de producción. La activación de la guanilato ciclasa soluble (GCs) es el principal mecanismo intracelular por el que el NO produce relajación (Fig. 4). Este enzima posee un grupo hemo al que se une el NO produciendo un cambio conformacional en la estructura que va a activar el centro catalítico (Lucas y cols., 2000; Carvajal y cols., 2000), convirtiendo el GTP en GMPc. El GMPc, en las células musculares lisas, activa la PKG que dispara reacciones de fosforilación que provocan la relajación de las células musculares lisas (Lincoln y cols., 2001) como consecuencia de la disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ y la reducción de la sensibilidad al Ca^{2+} de la maquinaria contráctil. Así, la PKG activa canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} , de forma que se produce una hiperpolarización de la membrana celular, que conduce a la inhibición de la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Estos canales de Ca^{2+} pueden también ser fosforilados directamente por la PKG, lo que provoca su inactivación en las células musculares lisas y la consiguiente disminución de la $[Ca^{2+}]_i$. Otras dianas de la PKG son las Ca^{2+} -ATPasas de la membrana plasmática y de la membrana del retículo sarcoplasmático (SERCA), de forma que se activa la salida de Ca^{2+} de la célula a través de la primera, y la recaptación de Ca^{2+} al interior del retículo a través

de la segunda. Además, la PKG fosforila el receptor de IP_3 de la membrana del retículo sarcoplasmático, cuya función es promover la salida de Ca^{2+} al citoplasma, disminuyendo así su actividad (Carvajal y cols., 2000). Por otro lado, la PKG fosforila la MLCK, inhibiendo así su actividad, lo que provoca que disminuya la fosforilación de la MLC_{20} y, por tanto, se produce inhibición de la contracción muscular (Marín y Rodríguez-Martínez, 1997; Lincoln y cols., 2001).

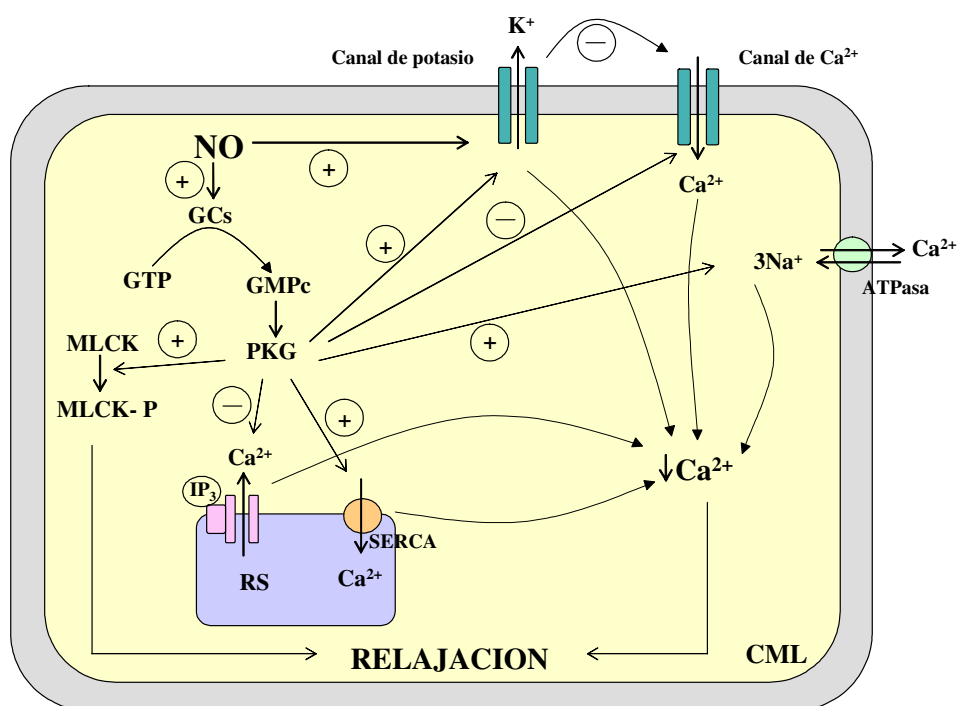


Fig. 4: Mecanismos de relajación inducidos por el NO. GCs: guanilato ciclasa soluble, PKG: proteína quinasa dependiente de GMPc, RS: retículo sarcoplasmático, SERCA: Ca^{2+} ATPasa del retículo sarcoplasmático, MLCK: quinasa de la cadena ligera de la miosina, IP_3 : inositol 1,4,5-trifosfato, CML: célula muscular lisa.

El NO promueve otros efectos independientes de la activación de la GCs, como son la activación directa de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} , que contribuye a la relajación en algunos vasos

(Bolotina, 1994). Además, es capaz de inhibir la citocromo C oxidasa (complejo IV de la mitocondria) y la enzima convertidora de angiotensina (ECA), o interaccionar con la ciclooxigenasa (COX) (Stoclet y cols., 1999). Otra reacción natural y habitual del NO es la formación de S-nitrosotioles (SNO). Estos compuestos han sido implicados en muchas de las propiedades biológicas del NO, fundamentalmente en su propiedad de unirse covalentemente a componentes críticos de proteínas celulares, como son los tioles o los metales de transición, pudiendo modificar así la función de dichas proteínas. Este es el caso de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} (Bolotina y cols., 1994) y los canales de Ca^{2+} sensibles a rianodina localizados en el retículo sarcoplasmático (Stoclet y cols., 1999). Además, como ya se ha comentado, el NO puede reaccionar con el $O_2^{\cdot-}$ rápidamente formando $ONOO^-$, que está implicado en procesos de citotoxicidad, de peroxidación de lípidos y nitración de proteínas.

Además de su efecto vasodilatador, el NO inhibe la agregación y activación plaquetarias, la proliferación de células musculares lisas de la pared vascular, la expresión de moléculas de adhesión celular, las interacciones plaqueta-leucocito y previene la oxidación lipídica. Todo ello va a contribuir a la disminución de la trombosis o a la reducción del reclutamiento de leucocitos, entre otras acciones protectoras del NO (Naseem, 2005).

1.2. Prostanoides

Otros factores que están implicados en la regulación del tono vascular, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, son los prostanoides. Dichos factores median muchas funciones fisiológicas, entre otras, la maduración del óvulo, inducción al parto, generación de fiebre, regulación de la agregación plaquetaria (Funk, 2001) y la contracción y relajación del músculo liso vascular (Wright y cols., 2001). Los prostanoides mejor caracterizados son la prostaglandina (PG) E_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGD_2 , PGI_2 y tromboxano (TX) A_2 . Todos estos prostanoides van a ejercer sus efectos a través de receptores acoplados a proteínas G (Wright y cols., 2001) (Fig. 5).

La enzima clave encargada de sintetizar los prostanoides es la prostaglandina H sintasa, denominada también ciclooxigenasa (COX). Todos ellos derivan del ácido araquidónico (AA), que se libera de los fosfolípidos de membrana tras la activación de la PLA_2 . Posteriormente, la COX transforma el AA en PGH_2 , que es el precursor de los prostanoides. La producción de cada uno de los prostanoides dependerá de las isomerasas que existan en cada tipo celular. Así, en las plaquetas se produce principalmente TXA_2 mediante la tromboxano sintetasa, mientras que en el endotelio es la PGI_2 el principal, aunque no el único, prostanoides sintetizado. La disponibilidad de AA y la actividad de la ciclooxigenasa, son puntos clave en la producción de las prostaglandinas. La COX posee dos actividades catalíticas, una ciclooxigenasa, que incorpora dos moléculas de O_2 al AA para dar PGG_2 , y otra peroxidasa, que cataliza la reducción de PGG_2 a PGH_2 (Davidge, 2001) (Fig. 5).

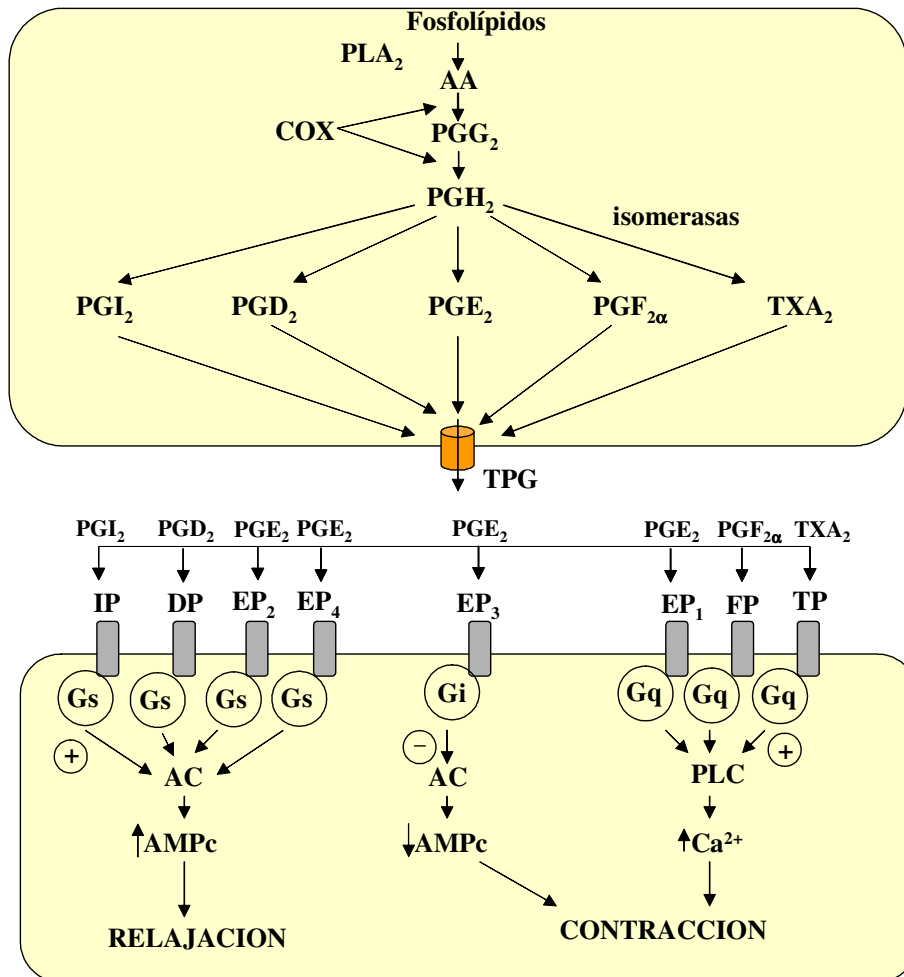


Fig. 5: Síntesis y mecanismos de acción de prostanoideos. AA: ácido araquidónico, AC: adenilato ciclasa, AMPc: Adenosin monofosfato cíclico, DP: receptor de la PGD₂, EP: receptor de PGE, FP: receptor de PGF_{2α}, IP: receptor de PGI₂, TP: receptor del TXA₂, PLA₂: fosfolipasa A₂, PLC: fosfolipasa C, TPG: transportador de prostaglandinas.

Se han descrito dos isoformas diferentes de la COX. COX-1 es una enzima que se expresa de forma constitutiva en la mayoría de las células. COX-2 se expresa en muchos tipos celulares en respuesta a estímulos inflamatorios como LPS o citoquinas como la IL-1 β ; sin embargo, se ha demostrado también que se expresa constitutivamente en determinadas zonas del cerebro y del riñón (Vane y cols., 1998), por lo que la expresión de COX-2 se relaciona, sobre todo, con estados de inflamación. En arterias mesentéricas la COX-2, se expresa en células endoteliales y adventiciales; tras la incubación con IL-1 β , la expresión de COX-2 puede ser detectada, además, en células musculares lisas (Briones y cols., 2005). Los genes de ambas isoformas se sitúan en los cromosomas 9 y 1, respectivamente. Existe un 65 % de homología entre las dos isoformas de una misma especie y su actividad catalítica es similar, pero no su regulación (Davidge, 2001). Ambas proteínas están localizadas en la membrana del retículo sarcoplasmático y en la envoltura nuclear en proporciones iguales (Spencer y cols., 1998).

El gen de COX-1 consta de 11 exones y da lugar a un ARNm de 2,8 Kb y a una proteína de 70 KDa. El promotor del gen de COX-1 no posee caja TATA; sin embargo, posee sitios de unión al factor activador Sp1 en el extremo 5'. La estructura del promotor de COX-1 es característica de genes "*housekeeping*" o genes con actividad constitutiva. Aunque la expresión de COX-1 es constitutiva en la mayoría de tejidos, se ha descrito expresión inducible del gen de COX-1 en varios tipos celulares, bajo diferentes estímulos (Tanabe y Tohnai, 2002; Ramsay y cols., 2003). El gen de COX-2 está formado por 10 exones y da lugar a un transcrito de 4,6 Kb y a una proteína con un peso molecular similar a la de COX-1. La expresión de COX-2

está regulada a nivel transcripcional y post-transcripcional. El promotor del gen de COX-2 contiene varios elementos reguladores, incluyendo una caja TATA, un sitio de unión para NF-IL6, dos sitios para AP-2, tres sitios para Sp1, dos para el factor nuclear kappa B (NFκB), un motivo CRE (elemento de respuesta de AMPc) y un sitio E-box (Tanabe y Tonhai, 2002). NFκB es uno de los principales factores que van a regular la expresión de COX-2. Multitud de factores como IL1β, LPS, factor de necrosis tumoral-α (TNF-α), interferón-γ (INFγ) o factores de crecimiento van a inducir la expresión de COX-2 a través de una cascada de señalización mediada por MAPK. El estrés mecánico y el estrés producido por el fluido sanguíneo, también inducen la síntesis de COX-2. Por otro lado, ligandos del receptor activador de la proliferación de peroxisomas (PPAR) y glucocorticoides reprimen la inducción de la expresión de COX-2. El ARNm de COX-2 posee una región 3'UTR; dicha región se transcribe pero no se traduce y está involucrada en la regulación post-transcripcional de la expresión de COX-2. La región 3'UTR posee numerosas secuencias ATTTA que desestabilizan el ARNm y promueven su degradación. Algunas MAPK como p38, promueven la estabilización del ARNm (Tanabe y Tohnai, 2002; Ramsay y cols., 2003) (Fig. 6).

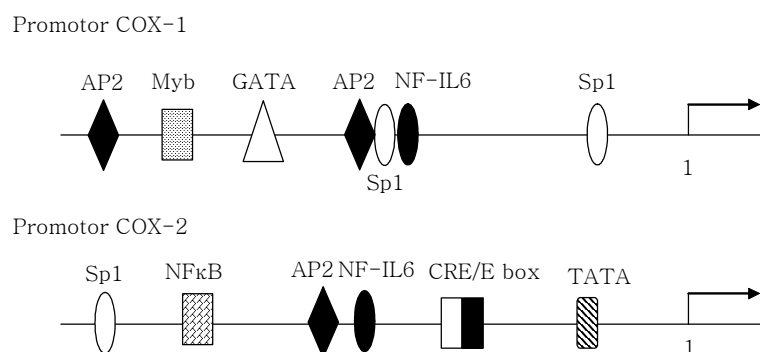


Fig. 6: Elementos de regulación en las regiones 5' de los promotores de COX-1 y COX-2.

Los prostanoides son liberados de las células que los sintetizan a través de transportadores y ejercen sus efectos por su unión con sus respectivos receptores. Así, nos encontramos con ocho receptores diferentes para los distintos prostanoides: TP es el receptor para TXA_2 , IP el receptor para PGI_2 , FP para $\text{PGF}_{2\alpha}$, DP para PGD_2 y para PGE_2 se han caracterizado 4 subtipos de receptores (EP_1 – EP_4). Todos estos receptores se han agrupado en tres grupos en base a su homología y a las propiedades atribuidas; IP, EP_2 , DP y EP_4 conforman el grupo de receptores cuya activación provoca relajación muscular; están acoplados a proteínas G_s y su activación estimula la adenilato ciclasa (AC) incrementando, por tanto, el AMPc y la relajación del músculo liso. El segundo grupo lo forman EP_1 , FP y TP, que están acoplados a proteínas G_q y van a mediar el incremento de Ca^{2+} intracelular provocando también vasoconstricción. El tercer grupo lo constituye el receptor EP_3 , que está acoplado a proteínas G_i y su activación inhibe la AC, disminuyendo los niveles de AMPc y provocando vasoconstricción (Wright y cols., 2001; Funk, 2001) (Fig. 5). El receptor TP también puede ser estimulado por otros prostanoides diferentes al TXA_2 como PGI_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ o PGE_2 (Dorn y

cols., 1992; Williams y cols., 1994). Otros productos que inducen contracción mediada por el receptor TP son los isoprostanos, que son isómeros de la $\text{PGF}_{2\alpha}$. Estos mediadores se producen a partir de ácidos grasos poliinsaturados, por un mecanismo no enzimático catalizado por radicales libres (Cracowski y cols., 2001). Sin embargo, algunos estudios han descrito la formación de isoprostanos a través de una vía dependiente de COX (Klein y cols., 1997; Jourdan y cols., 1997; Klein y cols., 2001).

En condiciones fisiológicas se produce un equilibrio entre la formación de prostanoides vasodilatadores y vasoconstrictores generados por COX, participando de ese modo en el mantenimiento del tono vascular; sin embargo, en algunas patologías vasculares, la producción de prostanoides de naturaleza contráctil va a estar incrementada (Davidge, 2001; Vanhoutte y cols., 2005).

1.3. Sistema Renina-Angiotensina

El sistema renina-angiotensina (SRA) juega un importante papel en la regulación de la presión sanguínea y de la homeostasis de los fluidos corporales. Originalmente fue considerado como un sistema circulante; sin embargo, se ha demostrado la existencia de un SRA local con todos los componentes del sistema presentes en diferentes tejidos como el cerebro, el riñón, la corteza adrenal, el corazón y los vasos sanguíneos (Bader y cols., 2001).

La angiotensina (Ang) II es el efector principal del SRA; se sintetiza por la acción de dos enzimas, renina y la enzima convertidora de angiotensina (ECA). La renina, proteína codificada por un solo gen, es sintetizada en las células yuxtaglomerulares de las arteriolas

renales aferentes. En primer lugar se forma un péptido no activo, prepro-renina, que va a sufrir modificaciones post-transduccionales para dar lugar a pro-renina. A través de una proteólisis intracelular, la pro-renina va a dar lugar a renina activa (Lumbers, 1999). El angiotensinógeno, precursor de la AngII y sintetizado en el hígado, va a ser transformado por la renina en AngI, un péptido formado por diez aminoácidos. La ECA va a actuar sobre la AngI para dar lugar al octapéptido AngII. A través de una aminopeptidasa A, que va a degradar el extremo N-terminal de la AngII, se forma AngIII. Esta, a su vez, es modificada por una aminopeptidasa B, que va a degradar el extremo N-terminal, dando lugar a AngIV. La AngII puede, a su vez, ser modificada por diferentes endopeptidasas de tejido que van a sintetizar AngII (1-7) (Fig. 7) (Lavoie y Sigmund, 2003). Recientemente ha sido descrita una isoforma de la ECA, ECA2, que va a transformar la AngII en Ang(1-7) (Ferreira y Santos, 2005).

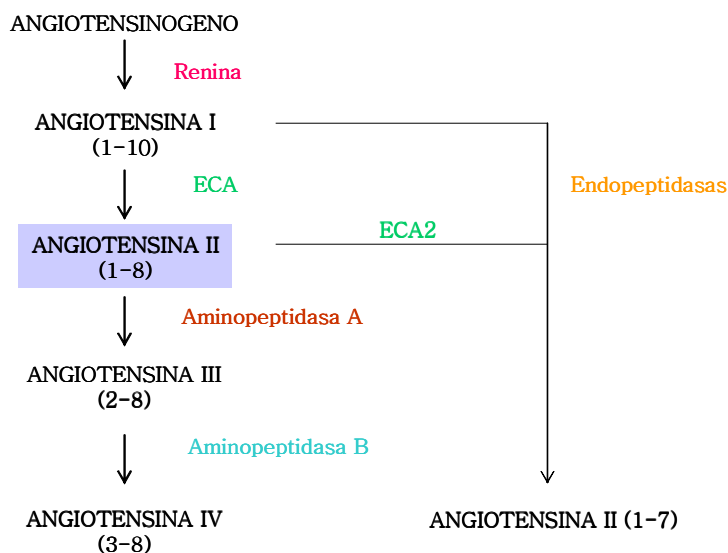


Fig.. 7: Esquema de los componentes del sistema renina-angiotensina.

La AngII media sus acciones biológicas a través de su unión a receptores específicos anclados en la membrana plasmática celular. Han sido identificados dos subtipos diferentes de receptores, AT₁ y AT₂. El gen del receptor AT₁, ubicado en el cromosoma 3 en la especie humana, codifica para una proteína de 359 aminoácidos con siete dominios transmembrana, y acoplada a proteínas G heterotriméricas. En roedores se han determinado dos subtipos del receptor AT₁, AT_{1a} y AT_{1b}, que son codificados por genes situados en los cromosomas 17 y 3, respectivamente. El receptor AT₂ está codificado por un gen en el cromosoma X y está formado por 363 aminoácidos. Contiene siete dominios transmembrana unidos a proteínas G heterotriméricas (Allen y cols., 2000) y posee un 37% de homología con el receptor AT₁. Además de AT₁ y AT₂, otro receptor identificado ha sido AT₄ o también conocido como IRAP (aminopeptidasa regulada por insulina), que se va a unir a AngIV (Touyz y Schiffrin, 2000). La farmacología de este receptor aún no está bien caracterizada. La Ang II(1-7) es ahora considerada un miembro activo del SRA. La importancia de dicho péptido ha sido reforzada por la identificación de su receptor, Mas, acoplado a proteínas G heterotriméricas (Ferreira y Santos, 2005).

El receptor AT₁ está presente en células musculares lisas y en la adventicia de los vasos, y es apenas detectable en el endotelio. En riñón, glándulas adrenales, corazón, cerebro y pulmón también existen receptores AT₁. Por su parte, AT₂ está presente en tejidos fetales pero su presencia disminuye después del nacimiento, lo que sugiere un importante papel de estos receptores en el desarrollo. Además, se han observado receptores AT₂ en páncreas, corazón, riñón, en la adventicia y en tejidos con funciones reproductivas. En adultos, la

expresión del receptor AT_4 es detectable en corazón, pulmón, riñón, cerebro e hígado (Touyz y Schiffrin, 2000). ARNm del receptor Mas para la AngII(1-7) ha sido detectado en corazón, testículos, riñón y cerebro (Ferreira y Santos, 2005).

La AngII juega un papel muy importante en la regulación de las funciones renales, vasculares y cardíacas. Así, estimula la transmisión sináptica, la secreción de vasopresina (hormona antidiurética), la vasoconstricción y la secreción de aldosterona por la corteza suprarrenal, y modula la ingesta de agua y la excreción renal de Na^+ . Además, participa en la regulación del tono vasomotor, del crecimiento celular, de la apoptosis y de la migración celular; induce la producción de los componentes de la matriz extracelular y posee características proinflamatorias (Tabla 1). Las múltiples acciones de la AngII están mediadas por complejos sistemas de señalización que se ponen en marcha cuando AngII se une a su receptor. La mayoría de las acciones de la AngII están mediadas a través del receptor AT_1 (Touyz y Schiffrin, 2000).

Receptor AT ₁	Receptor AT ₂
<ul style="list-style-type: none"> -Vasoconstricción -Síntesis y secreción de aldosterona -Reabsorción de Na⁺ en túbulos renales -Incremento en la secreción de vasopresina -Disminución del fluido renal -Inhibición de la renina renal -Hipertrofia cardíaca -Contratilidad cardíaca -Proliferación de células musculares lisas vasculares -Incremento de la actividad noradrenérgica periférica -Modulación de la actividad del sistema nervioso central -Formación de matriz extracelular -Aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno 	<ul style="list-style-type: none"> -Desarrollo de tejido fetal -Inhibición del crecimiento y proliferación celular -Vasodilatación -Modulación de la matriz extracelular -Regeneración celular -Diferenciación celular -Apoptosis

Tabla 1: Diferentes efectos de angiotensina II mediados por los receptores AT₁ y AT₂.

1.3.1 Mecanismos de señalización de la angiotensina II

Cuando AngII se une al receptor AT₁, en dominios especializados de la membrana denominados caveolas, se estimula la hidrólisis del PIP₂ por la PLC produciendo un aumento en la formación de IP₃ y DAG (Ishizaka y cols., 1998). El IP₃ estimula la liberación de Ca²⁺ del retículo sarcoplasmático, aumentando la [Ca²⁺]_i, y, por tanto, provocando la contracción de las células del músculo. Por otro lado, el DAG estimula la PKC, que se transloca a la membrana plasmática para fosforilar y activar proteínas que intervienen en funciones vasculares como la contracción y el crecimiento celular. La PKC media también la alcalinización intracelular del medio a través de la activación del intercambiador Na⁺/H⁺, el intercambiador Na⁺/Ca²⁺ y la Na⁺/K⁺ ATPasa lo que también produce contracción muscular debido al aumento de las concentraciones intracelulares de Na⁺ y Ca²⁺ y al aumento de la sensibilidad de la maquinaria contráctil al Ca²⁺. Además,

la PKC activa proteínas tirosín quinasas, que van a modular el crecimiento celular.

La activación del receptor AT_1 por AngII, estimula también una familia de proteínas tirosín quinasas, denominadas Src, que pueden ser activadas por receptores con actividad tirosín quinasa o pueden estar funcionalmente unidas a receptores acoplados a proteínas G, como son los receptores AT_1 . Src está implicada en la activación de PLC- γ , de MAPK, así como de factores de transcripción y de otras proteínas implicadas en las señales de transducción. La activación de tirosín quinasas por AngII estimula factores de transcripción como STAT (señal de transducción y activación de la transcripción), que van a migrar al núcleo para inducir la transcripción de genes, quinasas de adhesión focal (FAK) y adaptadores moleculares como $p130^{cas}$, que regulan la proliferación, migración, adhesión y la transformación celular. La activación de proteínas tirosín quinasas también implica la estimulación de la proteína fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y de MAPK. La activación de MAPK promueve la síntesis de proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular, en la contracción, de proteínas del citoesqueleto como proteínas asociadas a microtúbulos, proteína básica de la mielina o caldesmina, COX-2, canales de Ca^{2+} , e intercambiador Na^+/H^+ , proteínas todas ellas, que van a modular la contracción y el crecimiento celular (Touyz y Schiffrin, 2000).

Además, AngII activa PLA_2 , la cual está implicada en la síntesis de eicosanoides, importantes mediadores en la regulación del tono y la presión vascular arterial. La activación de la PLA_2 es dependiente de la $[Ca^{2+}]_i$, de la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina II y de la activación de MAPK. La AngII también activa la PLD, que va a

hidrolizar principalmente fosfatidilcolina para formar ácido fosfatídico y DAG, un importante mensajero en la cascada de señalización activada por la AngII. Esta es la principal vía por la que la PKC va a permanecer activada (Fig. 8) (Touyz y Schiffrin, 2000).

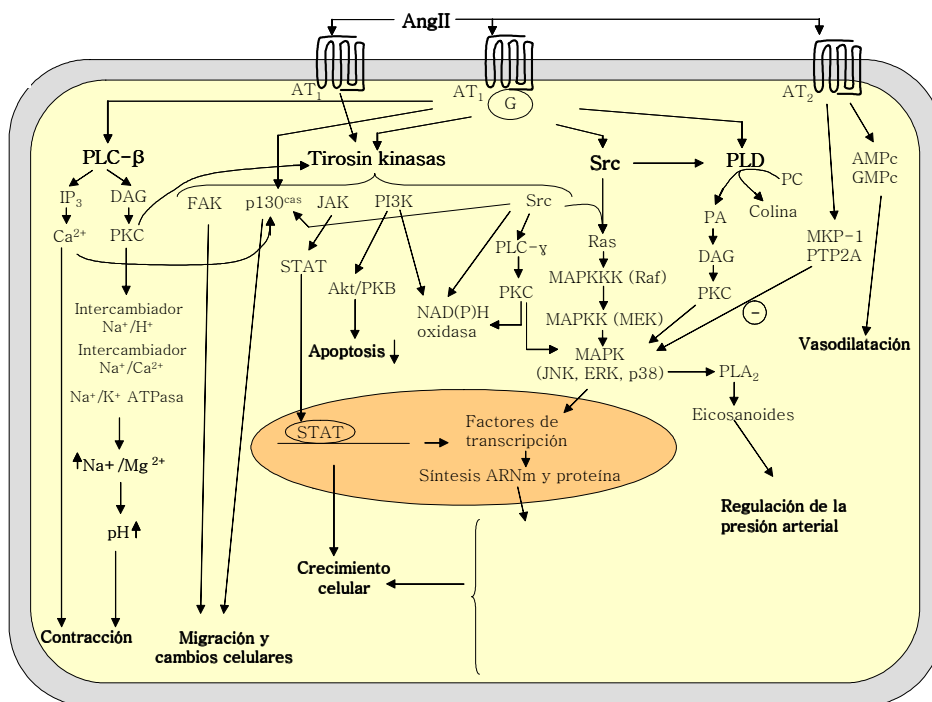


Fig. 8: Mecanismos de señalización mediados por la angiotensina II (AngII). Akt/PKB: proteína kinasa AKT/PKB, AMPc: adenosina monofosfato cíclico, DAG: diacilglicerol, ERK: quinasa regulada por señal extracelular, FAK: quinasa de adhesión focal, GMPc: guanosina monofosfato cíclico, IP₃: inositol 1,4,5-trifosfato, JAK: quinasa de la familia Janus, JNK: quinasa N-terminal de c-Jun, MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos, MAPKK: MAPK kinasa, MAPKKK: MAPKK quinasa, MKP-1: fosfoproteína de MAPK, PA: ácido fosfatídico, PC: fosfatidilcolina, PI3K: fosfatidil inositol 3 quinasa, PKC: proteína quinasa C, PLA₂: fosfolipasa A₂, PLC: fosfolipasa C, PP2A: proteínas tirosín fosfatasa 2A, STAT: activador de la transcripción y de la señal de transducción.

Los mecanismos de señalización mediados por el receptor AT_2 han sido estudiados en menor medida y no están tan definidos como los del receptor AT_1 . La AngII a través del receptor AT_2 media la activación de proteínas tirosín fosfatasas (PTP2A) que van a inhibir el crecimiento celular a través de la inhibición de MAPK (ERK). Aunque el mecanismo aún no está claro, AT_2 media vasodilatación a través de la liberación de NO y de nucleótidos cíclicos (Horiuchi y cols., 1999) (Fig. 8). También se ha relacionado el incremento de la producción de ceramidas, que pueden estar involucradas en el proceso de apoptosis celular, con la activación del receptor AT_2 (Kaschina y Unger, 2003). Por otro lado, se ha descrito que el receptor AT_2 puede estar involucrado en la respuesta inflamatoria observada en el daño renal a través de la activación del factor de transcripción NF κ B. Así, la activación de NF κ B en riñón con obstrucción unilateral del uréter, solamente es disminuida tras el tratamiento de los animales con antagonistas de ambos receptores AT_1 y AT_2 (Esteban y cols., 2004).

La AngII(1-7), tiene efectos opuestos a los observados para la AngII: produce vasodilatación, mejora la función endotelial y tiene efectos beneficiosos a nivel cardiaco. Muchos estudios han mostrado que las acciones vasculares de la Ang II(1-7) pueden estar mediadas por el incremento en la producción de prostanoïdes vasodilatadores, de NO y de factor hiperpolarizante derivado de endotelio. Además, la Ang II(1-7) es capaz de potenciar los efectos vasodilatadores de la bradikina (Ferreira y Santos, 2005).

Además de los efectos ya comentados, AngII estimula la generación de radicales libres, principalmente $O_2^{\cdot-}$, por activación de la NAD(P)H oxidasa (Griendling y cols., 1994; Touyz y Schiffrin,

2000). Las especies reactivas de oxígeno actúan como segundos mensajeros intracelulares e intercelulares y van a jugar un papel fundamental en el tono vascular, en el crecimiento celular y en la inflamación, como se describirá en el siguiente apartado.

La AngII estimula la producción de factores de crecimiento como PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), EGF (factor de crecimiento epidérmico), TGF- β (factor de crecimiento transformante β), IGF-1 (factor de crecimiento similar a insulina), bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico) o PAF (factor activador de plaquetas). Además, induce la síntesis de agentes contráctiles como endotelina-1, moléculas de adhesión como son ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular), VCAM-1 (molécula de adhesión de célula vascular), E-selectina e integrinas, e induce la síntesis de factores quimiotácticos como TNF- α (factor de necrosis tumoral α) o MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos) e interleuquina-6 (IL-6) (Touyz y Schiffrin, 2000; Das, 2005).

En la producción de todos estos mediadores proinflamatorios, el papel que juega el NF κ B es fundamental. Es un factor de transcripción temprana que modula la expresión de genes; es un heterodímero formado por dos subunidades, la subunidad transactivadora p65 y la subunidad de unión al ADN p50. En células sin estimular, NF κ B está unido a la proteína inhibitoria κ B (I κ B), que previene la translocación del factor de transcripción al núcleo celular y la unión de este al ADN. AngII incrementa la transcripción de genes proinflamatorios bajo el control del NF κ B. La infusión de AngII incrementa la activación de dicho factor de transcripción asociada a una sobreexpresión de citoquinas y quimiocinas; además, el tratamiento con antagonistas del

receptor AT_1 disminuye la activación de NF κ B y la expresión de TNF- α a nivel renal, y la inhibición del NF κ B con pirrolidin ditiocarbamato, mejora la inflamación y el daño tisular (Ruiz-Ortega y cols., 2003). La activación del NF κ B es dependiente tanto de AT_1 como de AT_2 , como ya se ha comentado, y el mecanismo por el cual se produce activación del NF κ B vía AT_1 es dependiente de señales redox, de la activación de tirosín kinasas y de MAPK, mientras que la activación de NF κ B vía AT_2 parece ser mediado por la producción de ceramidas (Ruiz-Ortega y cols., 2003). Recientemente, se ha demostrado que AngIV, a través de la unión a su receptor AT_4 , puede también incrementar el proceso inflamatorio y la activación de NF κ B (Esteban y cols., 2005).

1.4. Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas reactivas derivadas de oxígeno que se producen en todas las células aerobias y se caracterizan por tener electrones desapareados. Algunas de estas especies son altamente reactivas, como el radical hidroxilo (OH^\cdot), y otras, como O_2^\cdot y $ONOO^\cdot$, son menos reactivas. El H_2O_2 no es un radical libre puesto que no tiene electrones desapareados, pero se genera a partir de ellos. Las especies reactivas de oxígeno participan en los mecanismos de señalización celular, afectando así a las funciones celulares como son la contracción muscular, la expresión de genes, la proliferación, la migración y la muerte celular. Las ROS pueden actuar como segundos mensajeros actuando en cascadas de señalización en numerosos tipos celulares. Los agentes oxidantes van a inducir un incremento en la fosforilación de tirosinas debido a una inactivación de las proteínas tirosín fosfatasas (PTP). Receptores como PDGF-R y EGF-R, y proteínas

como Src, JAK2, STAT, Ras, Akt/PKB, con actividad tirosina quinasa también son reguladas por ROS. Además, las MAPK son proteínas sensibles al estado redox, y van a ser activadas por las especies reactivas de oxígeno, probablemente por inactivación de fosfatasa de las MAP quinasas (MKP), que son proteínas que regulan su actividad (Touyz, 2004b). Factores de transcripción como NF- κ B y el activador de la proteína 1 (AP-1) son redox sensibles y son activados por ROS. Estos factores de transcripción son responsables de la expresión de genes proinflamatorios como interleuquinas, moléculas de adhesión celular y proto-oncogenes (Griendling y cols., 2000a; Touyz, 2004b) (Fig. 9).

1.4.1. $O_2^{\cdot-}$

El anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) se forma a partir del oxígeno molecular por adición de un electrón. No tiene capacidad de atravesar las membranas lipídicas, por lo tanto, permanecerá en el compartimento donde es sintetizado. El $O_2^{\cdot-}$ es producido por la cadena respiratoria mitocondrial, por flavoproteínas como la xantina-oxidasa, por ciclooxigenasa y lipoxigenasa, o por la NOS en determinadas condiciones de déficit de sustrato o cofactores. Sin embargo, la principal fuente de $O_2^{\cdot-}$ en la pared de los vasos es la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NAD(P)H) oxidasa (Cai y cols., 2003).

La NAD(P)H oxidasa del sistema cardiovascular es una enzima asociada a membrana que cataliza la reducción del oxígeno utilizando NADH o NADPH como donadores de electrones. Este complejo enzimático fue originalmente identificado y caracterizado en fagocitos, donde juega un importante papel en la defensa contra

microorganismos, sin embargo, la enzima vascular parece diferir de la NAD(P)H oxidasa de neutrófilos. Así, estudios que comparan la producción de $O_2^{\cdot-}$ por ambas enzimas, sugieren que la actividad de la NAD(P)H oxidasa vascular es una tercera parte que la de neutrófilos, además de poseer actividad constitutiva (Griendling y cols., 2000b).

La NAD(P)H oxidasa está formada por dos subunidades transmembrana, gp91 y p22phox que van a formar el citocromo b558, y unos componentes citosólicos, cuya presencia puede variar en función del tipo celular, como son p47phox, p67phox, p40phox y Rac, que se van a unir a las subunidades que forman el componente transmembrana (Soccio y cols., 2005) (Fig. 9). En los últimos años se han caracterizado siete isoformas de gp91 denominadas nox1-7; la subunidad gp91 encontrada inicialmente en macrófagos corresponde a la isoforma nox2. Tanto nox2 como nox4 están expresadas en células vasculares como las células musculares lisas y células endoteliales (Ray y Shah, 2005). La subunidad p22phox tiene un importante papel en la producción de $O_2^{\cdot-}$, mientras que p47phox facilita la unión de p67phox y rac. La subunidad p40phox parece jugar un papel importante en la regulación de la actividad oxidasa del enzima y en la unión de p47phox y p67phox al citocromo b558 (Soccio y cols., 2005).

La activación de la NAD(P)H oxidasa es un proceso que se inicia por la fosforilación en serinas de la p47phox, lo que dispara la formación del complejo de las proteínas citoplasmáticas, que se van a translocar a la membrana para unirse al citocromo b558 e iniciar la actividad oxidasa. Entre los estímulos que van a inducir la activación de la NAD(P)H oxidasa se encuentran factores de crecimiento, citoquinas, fuerzas mecánicas y lípidos (Brandes y Kreuzer, 2005). La

AngII es uno de los factores vasoactivos más importantes en la vasculatura que van a estimular la producción de $O_2^{\cdot-}$ a través de la activación de la NAD(P)H oxidasa. La activación por AngII de la PKC, de Src, de PI3K y de Rac parecen jugar un papel importante en la activación de NAD(P)H oxidasa (Cai y cols., 2003; Brandes y Kreuzer, 2005).

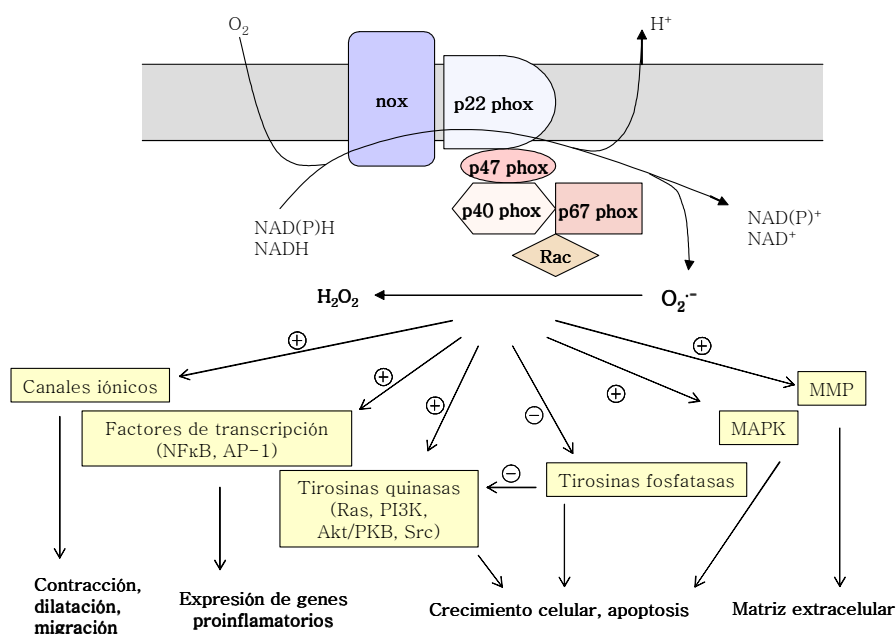


Fig. 9: Vías de señalización dependientes de especies reactivas de oxígeno. Akt/PKB: proteína kinasa AKT/PKB, AP-1: activador de la proteína 1, NFκB: factor nuclear κB, MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos, MMP: metaloproteinasas, PI3K: fosfatidil inositol 3 quinasa. Modificado de Griendling y cols., 1997 y de Touyz, 2004.

El $O_2^{\cdot-}$ es una importante molécula de señalización intracelular que participa en la regulación del crecimiento y en los mecanismos de defensa de fagocitos. Así, las ROS van a inducir apoptosis, expresión de moléculas de adhesión o angiogénesis en células endoteliales, y crecimiento, migración celular y expresión de genes implicados en la inflamación en células musculares lisas vasculares; NFκB es uno de

los factores de transcripción que se activa por $O_2^{\cdot-}$ (Taniyama y Griendling, 2003). Por otro lado, el $O_2^{\cdot-}$ induce contracción vascular (Tosaka y cols, 2002; Didion y Faraci, 2002), vasodilatación (Marín y Rodríguez-Martínez, 1995) y modula la contracción a diferentes agonistas (Srivastava y cols., 2002). El $O_2^{\cdot-}$ puede tener efectos contráctiles por su capacidad para inactivar el NO, y respuestas vasodilatadoras a través de la formación de $ONOO^-$, que va a estimular la GCs, y de la formación de un factor relajante de naturaleza desconocida que abre canales de K^+ sensibles a glibenclamida (Marín y Rodríguez-Martínez, 1995) (Fig. 10). La excesiva producción de $O_2^{\cdot-}$ ha sido implicada en el desarrollo de la hipertensión y otras patologías cardiovasculares (Dhalla y cols., 2000).

1.4.2. H_2O_2

La superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación de dos moléculas de $O_2^{\cdot-}$ a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y a oxígeno molecular (Nordberg y Arner, 2001). El H_2O_2 va a ser hidrolizado por la catalasa y por la glutatión peroxidasa (Dhalla y cols., 2000); además, también puede ser precursor de otros radicales como el $OH^{\cdot-}$.

El H_2O_2 tiene múltiples acciones vasomotoras (Fig. 10). Así, actúa como vasoconstrictor en algunos vasos como arterias renales (Gao y Lee, 2005), y como vasodilatador en arterias mesentéricas o coronarias (Hayabuchi y cols., 1998; Fujimoto y cols., 2001). Además, en arterias mesentéricas y aorta se han observado ambas acciones (Gao y cols., 2003; Gil-Longo y González-Vazquez, 2005). Por otro lado, el H_2O_2 modula o media la contracción inducida por vasoconstrictores como AngII y serotonina (Torrecillas y cols., 2000; Srivastava y cols., 2002). El H_2O_2 estimula la liberación de NO, lo que

induce activación de la GCs, provocando relajación. También se ha descrito que produce la activación de canales de K^+ que van a mediar vasodilatación (Gao y cols., 2003). Otros estudios han descrito al H_2O_2 como un factor hiperpolarizante que participa en la relajación de vasos (Sobey y cols., 1997; Miura y cols., 2003). Por otro lado, también puede provocar vasoconstricción mediada por la liberación de productos derivados de COX, como el TXA_2 (Marín y Rodríguez-Martínez, 1995; Rodríguez-Martínez y cols., 1998; Gao y Lee, 2001). En aorta de ratas Sprague-Dawley se ha descrito contracción inducida por H_2O_2 a través de un mecanismo dependiente del receptor de ATP (Shen y cols., 2000). Por otra parte, esta molécula puede participar en la regulación de genes cuya transcripción está controlada por el NF κ B (Lu y Wahl, 2005).

1.4.3. OH^-

El ión hidroxilo (OH^-) es considerada la especie más reactiva y perjudicial. Se genera a partir de H_2O_2 en una reacción catalizada por iones metálicos (Fe^{2+} , Cu^+) (Nordberg y Arner, 2001). También se puede generar a partir del H_2O por la acción de radiaciones electromagnéticas de baja longitud de onda y por la degradación del $ONOO^-$ (Darley-Usmar y Halliwell, 1996). El OH^- puede inducir contracción en aorta por mecanismos dependientes de PKC, PI3K, proteínas tirosín kinasas (Li y cols., 2004), así como mediar vasodilatación activando la GCs (Marín y Rodríguez-Martínez, 1995) (Fig. 10).

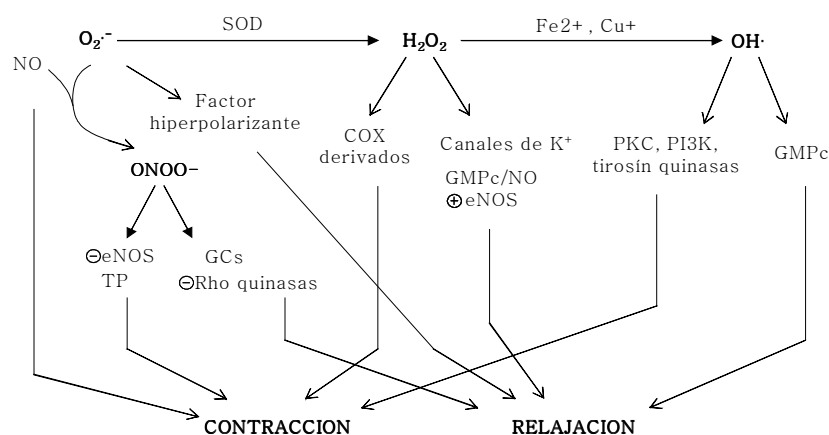


Fig. 10: Mecanismos de contracción y relajación producidos por especies reactivas de oxígeno. COX: ciclooxigenasa, eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial, GCs: guanilato ciclasa soluble, GMPC: guanosín monofosfato cíclico, H_2O_2 : peróxido de hidrógeno, $\text{O}_2^{\cdot-}$: anión superóxido, OH^{\cdot} : radical hidroxilo, ONOO^- : peroxinitrito, PI3K: fosfatidil inositol 3 quinasa, PKC: proteína quinasa C, TP: receptor del TXA_2 .

1.4.4. ONOO^-

Cuando los niveles de NO se incrementan hasta un rango del orden de nanomolar, éste compite con la SOD por el $\text{O}_2^{\cdot-}$, dando lugar a ONOO^- (Wolin, 2000). La peroxidación de lípidos, el daño de la cadena de ADN o la nitrosilación de proteínas, son algunos de los efectos de este compuesto (Stoclet y cols., 1999). Por otra parte, puede mediar vasoconstricción por un mecanismo dependiente del receptor del TXA_2 (TP), además de inhibir la actividad de eNOS, y mediar vasodilación por un mecanismo dependiente del NO y a través de la inhibición de Rho quinasas (Belik y cols., 2004) (Fig 10).

1.5. Otros factores

La endotelina (ET) es otro importante factor vasoconstrictor sintetizado por células endoteliales y musculares lisas (Yanagisawa y cols., 1988). Existen tres isoformas diferentes de la ET, de las que la ET-1 es la principal forma sintetizada por el músculo liso. Media sus efectos a través de su unión a los receptores de la ET, habiéndose descrito dos subtipos, ET_A y ET_B. Ambos receptores se expresan en células musculares lisas, con mayor predominio de ET_A, donde media vasoconstricción y regulación del crecimiento celular. En células endoteliales, sin embargo, los receptores ET_B van a inducir vasodilatación a través de la producción de NO y PGI₂ (White y cols., 2002; Schiffrin, 2005).

Existe un factor endotelial, diferente a los anteriormente mencionados, que media vasodilatación de los vasos, al que se ha denominado factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF) (Chen y cols., 1988). La dilatación mediada por EDHF parece tener más importancia en arterias de resistencia y arteriolas (Tomiooka y cols., 1999). Se sabe que este factor media relajación a través de la activación de canales de potasio dependientes de Ca²⁺, provocando la hiperpolarización de las células musculares lisas. Aunque aún no se conoce la naturaleza del EDHF, se ha sugerido que pueda tratarse de un derivado del metabolismo del ácido araquidónico como son los ácidos epoxieicosatrienoico o hidroxieicosatetraenoico, sintetizados por la epoxigenasa y la lipoxigenasa, respectivamente. Otros posibles candidatos que pueden actuar como EDHF son el catión monovalente K⁺ o el H₂O₂ (Bryan y cols., 2005).

2. Alteraciones vasculares con la hipertensión

La hipertensión se caracteriza por un incremento en la resistencia vascular periférica acompañada de un incremento en la presión arterial. Alrededor de un 20% de la población de países desarrollados tiene aumentada la presión arterial, lo que implica un mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. En el último informe del Comité Nacional Conjunto en Prevención, Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipertensión Arterial, se determinó establecer dos estados de hipertensión y uno de prehipertensión (Chobanian y cols., 2003). Así, los individuos con una presión arterial sistólica (PAS) de entre 120–139 mmHg y una presión arterial diastólica (PAD) de entre 80–90 mmHg, estarían en un estado prehipertenso; individuos con una PAS de entre 140–159 mmHg y una PAD de 90–99 mmHg, se encontrarían en el estado 1 de hipertensión, e individuos con una PAS \geq 160 mmHg y una PAD \geq 100 mmHg presentarían un estado 2 de hipertensión (Chobanian y cols., 2003). La hipertensión arterial sistémica se clasifica etiológicamente en dos grupos: primaria o esencial y secundaria. La hipertensión secundaria es aquella cuyas causas son conocidas, entre las que se incluyen alteraciones renovasculares, coartación de la aorta, hiperaldosteronismo o hipertiroidismo (Akpunonu y cols., 1996). La etiología de la hipertensión esencial no se conoce y la causa puede ser multifactorial, aunque existen factores ambientales y genéticos que contribuyen al mantenimiento de la elevada presión arterial (Carretero y Oparil, 2000).

Como se ha comentado anteriormente, los factores liberados por el endotelio juegan un importante papel en la regulación de la

homeostasis de la pared vascular. Variaciones en la función endotelial son consideradas uno de los principales factores responsables del incremento y mantenimiento de la presión arterial. Así, en determinados modelos de hipertensión se ha observado una disminución de las relajaciones dependientes de endotelio (Marín y Rodríguez-Martínez, 1997). Sin embargo, se han descrito también respuestas aumentadas (Dowell y cols., 1999) y normales (Lüscher y cols., 1988) dependiendo del lecho vascular o el modelo de hipertensión estudiado. Además de la disfunción endotelial observada con la hipertensión, se han observado también diferencias en las respuestas contráctiles a diferentes agonistas. Así, podemos encontrar respuestas aumentadas tras la estimulación con diferentes agonistas (Dowell y cols., 1999; Dohi y cols., 1996; Zerrouk y cols., 1998) o respuestas disminuidas (Rossoni y cols., 2002a; 2002b). Por otra parte, numerosos estudios han relacionado la hipertensión con un incremento del tono simpático y con alteraciones en la biodisponibilidad de Ca_2^+ , entre otras modificaciones (Marín, 1993).

Además de los cambios funcionales, la hipertensión produce cambios estructurales y bioquímicos en las distintas capas de la pared vascular. Las alteraciones estructurales, como el remodelado vascular, que ocurren en los vasos de resistencia, van a ser consecuencia o causa del incremento de la resistencia periférica (Mulvany, 2002). Los vasos están formados por tres capas bien diferenciadas, íntima, media y adventicia. La capa íntima está formada por el endotelio y está separada de la capa media, formada básicamente por células musculares lisas, por la lámina elástica interna. La adventicia está formada por terminaciones nerviosas, fibroblastos y fibras de colágeno (Mulvany, 2005). Muchos estudios

han demostrado que la hipertensión está asociada a un remodelado de los vasos de resistencia. Así, puede observarse remodelado eutrófico, cuando se produce una disminución del diámetro externo e interno (lumen) y/o un aumento en la relación media:lumen, sin observar aumento en el área de la sección media, y acompañado de un reordenamiento celular (Schiffrin y Touyz, 2004). Por otro lado, también podemos encontrar un remodelado hipertrófico cuando se produce un aumento en el área de la sección media, asociado a un aumento de material. En este caso, se produce un aumento en la síntesis de matriz extracelular, sobre todo de proteínas como el colágeno y la fibronectina. Además la actividad de enzimas encargadas de la degradación de la matriz extracelular, metaloproteinasas, también puede estar disminuida con la hipertensión, de forma que el aumento en la síntesis de proteínas de matriz se deba a una disminución en su degradación y no a un aumento en su producción (Touyz, 2005).

2. 1. Alteraciones en la vía del NO

La disfunción endotelial observada con la hipertensión puede ser explicada por la disminución en la producción de NO que varios autores han descrito (Chou, 1998; Dowell y cols., 1999). Sin embargo, hay estudios que demuestran un incremento en la síntesis de NO, probablemente como mecanismo compensatorio frente al incremento en la presión arterial (Briones y cols., 2000; Maffei y cols., 2002; Rossoni y cols., 2002b). Inhibidores endógenos de la NOS como es el N(G),N(G')-dimetilarginina (ADMA) se han encontrado en el plasma de pacientes hipertensos, y un aumento en sus niveles ha sido asociado con un incremento en el riesgo de enfermedad cardiovascular (Lenzen

y cols., 2006). Algunos grupos han descrito que las relajaciones dependientes de endotelio están empeoradas debido a una deficiencia en el transporte de la L-arginina, precursor del NO, a través de la membrana celular, provocando así la deficiencia de sustrato para eNOS, y por tanto, la disminución en la formación de NO (Schlaich y cols., 2004). Por otro lado, se han observado alteraciones en la vía de la GC-GMPc; así, en aorta de ratas hipertensas ha sido descrita una disminución en la expresión de GC seguida por una disminución de los niveles de GMPc y, una disminución en la respuesta a NO (Ruetten y cols., 1999; Kagota y cols., 2002; Courtois y cols., 2003).

A pesar de lo anteriormente mencionado, los mecanismos más aceptados hoy en día para explicar la disfunción endotelial se asocian a la disminución de la biodisponibilidad de NO, bien por un incremento en su metabolismo por O_2^- , que están aumentados con la hipertensión (Kerr y cols., 1998; Bauersachs y cols., 1998), y/o por un enmascaramiento de sus efectos al incrementarse la producción de prostanoïdes contráctiles (Dohi y cols., 1996; Zhou y cols., 1999).

Además de las alteraciones en la producción o biodisponibilidad del NO, se ha observado que tanto la expresión como la actividad de las diferentes isoformas de la NOS también puede sufrir modificaciones con la hipertensión. Así, se han descrito tanto una disminución en la actividad y expresión de eNOS en aorta de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) (Chou y cols., 1998) y en ratas Dahl sal-sensibles (Zhou y cols., 2004), como un incremento en su expresión (Vaziri y cols., 2000; Ülker y cols., 2003; Vaziri y Ni, 2005). Por otro lado, tanto la expresión vascular de nNOS (Boulanger y cols., 1998; Briones y cols., 2000; Rossoni y cols., 2002b) como la de iNOS

(Chou, 1998; Vaziri y cols., 2000; Briones y cols., 2000) se ha descrito que está incrementada en diferentes modelos de hipertensión.

2. 2. Alteraciones en la vía de la COX

Además de las alteraciones en la producción de NO, muchos estudios demuestran un incremento en la síntesis de factores endoteliales contráctiles derivados de COX en determinados modelos de hipertensión (Vanhoutte, 1995; Taddei y cols., 1997; Davidge, 2001). Estos derivados podrían ser responsables del deterioro de las relajaciones dependientes de endotelio asociadas a la hipertensión (Dohi y cols., 1996; Zhou y cols., 1999), así como del incremento en la vasoconstricción inducida por agonistas (Taddei y Vanhoutte, 1993; Lin y cols., 1994; Dohi y cols., 1996; Zerrouk y cols., 1998). Por otro lado, elevadas concentraciones de acetilcolina son capaces de provocar contracciones endotelio-dependientes en arterias de animales hipertensos, asociadas a la generación de derivados de la COX (Rapoport y Williams, 1996; Zhou y cols., 1999). El aumento en la producción de prostanoides contráctiles derivados de COX puede ser consecuencia del incremento en la expresión de COX-1, aunque también se ha observado que la respuesta producida por endoperóxidos está incrementada en arterias de ratas hipertensas, indicando una hipersensibilidad a estos compuestos con la hipertensión (Ge y cols., 1995). Por otro lado, estudios recientes demuestran que productos derivados de COX-2 también pueden contribuir a la disfunción endotelial durante la hipertensión (Widlansky y cols., 2003); así, se ha observado un aumento en la expresión de esta isoforma en animales hipertensos (Henrion y cols., 1997; García-Cohen y cols., 2000; Briones y cols., 2002b; Adeagbo y cols., 2005),

cuyos productos estarían participando, además, en la respuesta vasoconstrictora mediada por el estrés oxidativo (García-Cohen y cols., 2000). También se ha descrito un aumento en la sensibilidad a los prostanoideos, probablemente por incremento en la sensibilidad de la maquinaria contráctil al Ca^{2+} (Ungvari y Koller, 2000).

COX-2 es inducida por una serie de estímulos, incluyendo factores de crecimiento y citoquinas. Además, la AngII también modula la expresión y actividad de COX-2 en diferentes tejidos y tipos celulares. Así, Jaime y cols. (2005), han descrito en el glomérulo y en células mesangiales un incremento de la producción de PGE_2 y PGI_2 tras la estimulación con AngII, que es dependiente del incremento en la expresión y actividad de COX-2. Otros autores también han descrito inducción de la expresión de COX-2 por AngII a nivel renal (Hernández y cols., 2002), en células musculares lisas vasculares (Ohnaka y cols., 2000; Young y cols., 2000; Hu y cols., 2002) y en arterias coronarias (Rocha y cols., 2002). La expresión de COX-2 inducida por AngII disminuye después del tratamiento con antagonistas del receptor AT_1 , implicando así a este receptor en el proceso de inducción de COX-2 por AngII (Ohnaka y cols., 2000; Hu y cols., 2002; Manucha y cols., 2004). El incremento en la expresión de COX-2 inducida por AngII es mediado por ROS, en concreto por $\text{O}_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 , y por la activación de MAPK (Ohnaka y cols., 2000; Jaimes y cols., 2005). Por otra parte, se ha descrito que el estrés oxidativo *per se* puede, además de la AngII, alterar la expresión y la actividad de la COX-2. Existen varias evidencias que demuestran el papel de las ROS en la modulación de la expresión de COX-2. Así, se ha observado inducción de COX-2 mediada por ROS en células mesangiales (Tetsuka y cols., 1996; Kiritoshi y cols., 2003) y en células

endoteliales humanas (Cosentino y cols., 2003). Por otro lado, el estrés oxidativo inducido con ter-butil hidroperóxido, incrementa la expresión de COX-2 en mayor medida en aorta de ratas hipertensas que en aorta de ratas normotensas (García-Cohen y cols., 2000). En ratas diabéticas, el tratamiento con tempol, un análogo de la SOD, disminuye la producción de PGE₂ y PGI₂ a través de la disminución en la expresión de COX-2 (Li y cols., 2005). Tanto la actividad del SRA como el estrés oxidativo se incrementan con la hipertensión, por lo que podrían ser responsables del aumento de la expresión de COX-2 observado en la hipertensión.

2. 3. Alteraciones en el sistema renina-angiotensina

La AngII no solo produce vasoconstricción a través de la activación de PLC, sino que desencadena la activación de tirosín kinasas, que están asociadas con el crecimiento, inflamación, migración y fibrosis celular. Esto sugiere que AngII es crucial en el mantenimiento de la integridad estructural y funcional de la pared de los vasos, y que podría jugar un importante papel en enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, entre otras (Fig. 11). Las terapias con inhibidores de la ECA o con antagonistas del receptor de la AngII AT₁ son muy utilizadas y efectivas para el tratamiento de la hipertensión arterial, evidenciando un importante papel del SRA en el mantenimiento de la hipertensión. De hecho, la infusión de AngII en ratas incrementa la presión arterial y disminuye las relajaciones dependientes de endotelio (Rajagopalan y cols., 1996), que son restauradas tras el tratamiento con losartán, un antagonista de los receptores AT₁ de la AngII.

Como veremos a continuación, la AngII también media daño tisular a través de la inducción de un proceso inflamatorio en el que se observa un incremento en la expresión de citoquinas y quimiocinas, moléculas de adhesión celular e infiltración de leucocitos/monocitos. Este proceso es dependiente del estrés oxidativo mediado por AngII. Además, AngII participa en el remodelado vascular a través de la regulación del crecimiento celular, hipertrofia/hiperplasia, y de la fibrosis tisular. Este crecimiento inducido por AngII está principalmente mediado por factores de crecimiento como bFGF, PDGF, factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF), y TGF- β (Cheng y cols., 2005). Las alteraciones en la estructura de la pared vascular, derivan en el desarrollo de varias complicaciones vasculares. Así, en la hipertensión, la fibrosis vascular se asocia a un incremento en la producción de proteínas de la matriz extracelular como son el colágeno y la fibronectina, destrucción de fibras elásticas, e hipertrofia de células musculares lisas, siendo la AngII, a través de la inducción del TGF- β , un importante mediador de estas alteraciones estructurales (Ruiz-Ortega y cols., 2003). Por otra parte, la infusión de AngII en ratas produce la deposición de proteínas de matriz en arterias y riñón y, además, regula la expresión de factores de crecimiento profibróticos (Lombardi y cols., 2001). Todo ello desemboca en hipertrofia cardíaca, vascular y renal que disminuye con inhibidores del SRA, además de la disminución en la expresión de los factores de crecimiento (Kim e Iwao, 2000; Cheng y cols., 2005). La disminución en la degradación de las proteínas de la matriz por las metaloproteinasas, también es responsable de su acumulación. Así, en pacientes hipertensos, con elevados niveles de precursores del colágeno, las concentraciones de determinadas

metaloproteinasas están reducidas (Laviades y cols., 1998). La inducción del inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1) por AngII está involucrado en los efectos trombóticos y fibrosos de la AngII (Ruiz-Ortega y cols., 2003). En los últimos años, se ha descrito un nuevo factor profibrótico, el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF). Este factor ha sido involucrado en el desarrollo de varias enfermedades asociadas con la fibrosis, el infarto de miocardio y el daño renal. En células musculares lisas vasculares, CTGF regula la proliferación, migración y producción de proteínas de matriz. La expresión de CTGF y la fibrosis a la que se asocia, están incrementadas en ratas infundidas con AngII. La expresión de este factor, disminuye tras el tratamiento con antagonistas del receptor AT₁ de la AngII; además, el incremento de la expresión de CTGF inducido por AngII está mediado por TGF- β (Rupérez y cols., 2003). Entre los mecanismos moleculares que median fibrosis vascular inducida por AngII, se encuentra la activación de MAPK, de tirosín quinasas, de factores de transcripción como AP-1, de PKC, o de proteínas Rho quinasas.

En ratas SHR, se ha descrito un aumento en la producción de AngII y un aumento en la expresión del ARNm del receptor AT₁ y de la ECA (Otsuka y cols., 1998). Además, los procesos intracelulares de señalización mediados por la AngII vía receptor AT₁ están incrementados con la hipertensión, lo que va a contribuir a las alteraciones en la contractilidad, en el crecimiento celular y desarrollo de la pared de los vasos, en la expresión de genes proinflamatorios o en la formación de proteínas de la matriz extracelular (Touyz y Schiffrin, 2000). Por otra parte, se ha observado un aumento en las respuestas contráctiles a AngII en aorta de animales hipertensos,

asociado a un aumento en la producción de prostanoïdes contráctiles derivados de COX-2 (Zerrouk y cols., 1998). Además, la AngII induce disfunción endotelial y en pacientes hipertensos, la inhibición del SRA aumenta las relajaciones endotelio-dependientes, al contrario que el antagonista de los receptores β atenolol, que no mejora las relajaciones a pesar de disminuir la presión arterial (Schiffrin y cols., 2002), lo que implica al SRA en el deterioro de la relajación endotelial. La formación de $O_2^{\cdot-}$ por la NAD(P)H oxidasa tras la activación con AngII podría estar participando en la disminución de la relajaciones endotelio dependientes observadas con la hipertensión (Rajagopalan y cols., 1996).

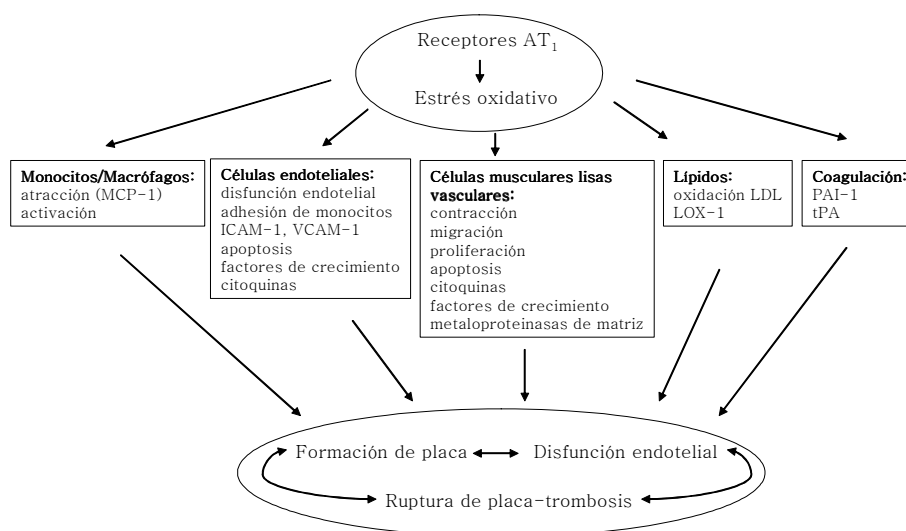


Fig. 11: Procesos celulares mediados por angiotensina II. ICAM-1: molécula de adhesión intracelular 1, LDL: lipoproteína de baja densidad, LOX-1: lipoxigenasa, MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos, PAI-1: inhibidor de la actividad de plasminógeno 1, tPA: activador de plasminógeno tisular, VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular 1. Modificado de Nickenig (2002).

2. 4. Alteraciones en el estado oxidativo

En condiciones patológicas, un desequilibrio entre la formación de las ROS y su degradación por parte de enzimas antioxidantes, resulta en el incremento de la disponibilidad de ROS, provocando un estado de estrés oxidativo.

Diferentes evidencias implican al estrés oxidativo con la patogénesis de la hipertensión. Entre ellas, podemos citar las siguientes: 1) la inducción de estrés oxidativo con Pb se asocia a un incremento en la presión arterial (Courtois y cols., 2003); 2) la inhibición de la glutatión sintasa en ratas con presión arterial normal incrementa las ROS y la presión sanguínea (Vaziri y cols., 2000); 3) el tratamiento de ratas hipertensas con antioxidantes como el análogo de la SOD, tempol, o vitamina E, disminuye la presión arterial y mejora las relajaciones endotelio dependientes (Chen y cols., 2001; Park y cols., 2002; Yanes y cols., 2005); 4) la sobreexpresión del gen de la SOD en ratas hipertensas disminuye los niveles de presión arterial (Chu y cols., 2003), y 5) la producción de aniones superóxido está incrementada en diferentes modelos de hipertensión, (Kerr y cols., 1998, Manning y cols., 2005), y se han observado niveles elevados de O_2^- y de H_2O_2 en pacientes con hipertensión esencial (Lacy y cols., 1998). Este aumento en la producción de O_2^- altera el metabolismo del NO, ya que se unen para formar $ONOO^-$, lo que puede explicar tanto la disminución de la biodisponibilidad de NO, como la disminución de las relajaciones dependientes de endotelio descritas en esta patología. Por su parte, el tratamiento con tempol incrementa la liberación de nitritos y nitratos en orina de animales tratados (Yanes y cols., 2005) y, las relajaciones dependientes de endotelio mejoran en

arterias de ratas hipertensas tratadas con SOD (Sekiguchi y cols., 2004).

El aumento del estrés oxidativo con la hipertensión puede ser debido a una disminución de los sistemas barredores de radicales libres o a un incremento en la actividad de las enzimas generadoras (Vega y cols., 1995; Dhalla y cols., 2000; Cai y Harrison, 2000). Así, se ha descrito una disminución en la actividad de barredores de ROS como SOD, catalasa y glutathion peroxidasa en diferentes tejidos de ratas SHR (Hector-Polizio y Peña, 2005). Sin embargo, también existen resultados contrarios con un incremento en la expresión y actividad de SOD y glutathion peroxidasa en aorta de ratas hipertensas, que se interpreta como un mecanismo adaptativo para disminuir la elevada producción de O_2^- (Fukai y cols., 1999; Ulker y cols., 2003). Por otro lado, alteraciones en la función de enzimas como la xantina oxidasa, NADP/NADPH oxidasa o la NOS durante la hipertensión, pueden participar en el aumento del estrés oxidativo. Así, tanto la actividad como la expresión de diversas subunidades de la NAD(P)H oxidasa están aumentadas con la hipertensión (Dhalla y cols., 2000; Hamilton y cols., 2001; Zalba y cols., 2001; Vaziri y Ni, 2005). Por otra parte, el desacoplamiento de eNOS, bien por la oxidación de su cofactor BH_4 , bien por la falta de sustrato L-Arginina, también puede incrementar la producción de O_2^- dependiente de eNOS (Landmesser y cols., 2003).

En situaciones fisiológicas existe una ajustada regulación de la producción y eliminación de las ROS en la vasculatura; sin embargo, varios agonistas y situaciones fisiopatológicas como la hipertensión, pueden provocar, como ya hemos comentado, una desregulación de

los niveles de actividad y expresión de los sistemas antioxidantes. La AngII es un potente estímulo para la producción de ROS en las células vasculares, potenciando la actividad de la NAD(P)H oxidasa, probablemente, a través del incremento en la expresión de sus subunidades y en el ensamblaje de las subunidades a la membrana plasmática. Factores de crecimiento como PDGF, EGF, TGF- β y citoquinas proinflamatorias como INF- γ , IL-1 o TNF- α , también promueven la activación de la NAD(P)H oxidasa. Incluso las propias ROS, actúan en la regulación de las enzimas oxidantes y antioxidantes (Wassmann y cols., 2004). En situaciones patológicas como la hipertensión, entre otras, donde la actividad del SRA y la formación de ROS están aumentadas, los procesos redox sensibles pueden contribuir a los procesos celulares que se desarrollan en la disfunción vascular y el remodelado estructural. Así, las ROS median crecimiento de las células musculares lisas vasculares, migración, deposición de colágeno, y la alteración de la actividad de metaloproteinasas de matriz en enfermedades cardiovasculares. Las ROS estimulan, además, la activación de factores de transcripción como NF κ B y AP-1, la expresión de moléculas de adhesión celular (Touyz, 2004b) y, como ya hemos comentado, las ROS pueden participar en la regulación de la expresión y la actividad de COX-2 (Jaimes y cols., 2005).

Las respuestas vasoconstrictoras pueden estar modificadas con la hipertensión. Algunos trabajos muestran un incremento en las contracciones producidas por ROS en aorta (Rodríguez-Martínez y cols., 1998) y en arteria mesentérica (Gao y Lee, 2001) de animales hipertensos; dichas contracciones son mediadas, en parte, por productos derivados de la COX (Hibino y cols., 1999; Rodríguez-Martínez y cols., 1998; Gao y Lee, 2001) como es el TXA₂ o PGH₂, ya

que son disminuídas por inhibidores de COX como indometacina o por antagonistas del receptor TP como SQ 29,548. Las ROS modulan la $[Ca^{2+}]_i$ que, como vimos, es el principal determinante de la contracción. Tabet y cols. (2004) han demostrado en células musculares lisas vasculares que H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ inducen aumentos de las $[Ca^{2+}]_i$, que son mayores en células de ratas SHR. Por otro lado, la hipertensión también puede alterar e incrementar la participación del $O_2^{\cdot-}$ en respuestas contráctiles a diferentes agonistas. Así, se ha observado que $O_2^{\cdot-}$ modula la contracción inducida por noradrenalina en arterias mesentéricas de ratas SHR, pero no en ratas WKY (Briones y cols., 2002b), y la contracción inducida por noradrenalina en aorta de ratas SHR (Wu y cols., 1998).

3. La hipertensión como enfermedad inflamatoria

En los últimos años se está dando especial importancia al proceso inflamatorio de la pared vascular en la patogénesis de la hipertensión y de otras enfermedades cardiovasculares. La reacción inflamatoria implica complejos procesos de interacción entre células inflamatorias como los neutrófilos, linfocitos o macrófagos y las células vasculares van a responder incrementando la expresión de moléculas de adhesión, citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento (Virdis y Schiffrin, 2003). Existen evidencias epidemiológicas que relacionan la hipertensión y el daño renal y vascular producido en la hipertensión con procesos inflamatorios. En pacientes con hipertensión arterial se han descrito elevados niveles circulantes de moléculas inflamatorias como proteína C reactiva (PCR), citoquinas (TNF- α , IL-6), quimiocinas (MCP-1) y moléculas de adhesión celular (P-selectina, ICAM-1), además de observar en

modelos animales de hipertensión infiltración de monocitos/macrófagos en la pared vascular y en determinados órganos como el riñón, corazón y cerebro (Pauletto y Rattazzi, 2006; Savoia y Schiffrin, 2006). Los mecanismos que provocan esta respuesta inflamatoria no están claros, pero pueden incluir mecanismos de estrés de la pared vascular dependientes de presión y efectos proinflamatorios de factores humorales como la AngII. La AngII puede actuar como una citoquina proinflamatoria (Cheng y cols., 2005; Ruiz-Ortega y cols., 2006). Así, AngII causa disfunción endotelial, aumenta la permeabilidad celular, y puede activar células inmunes circulantes. Además, AngII participa en la regulación de la expresión de moléculas de adhesión; así, moléculas como ICAM-1, VCAM-1, P-E-L-selectinas e integrinas, ven incrementada su expresión en distintos tipos celulares tratados con AngII y en modelos animales infundidos con AngII (Ruiz-Ortega y cols., 2006). Además, antagonistas de los receptores de AngII e inhibidores de la ECA disminuyen la expresión de estas moléculas en modelos animales de hipertensión, como ratas SHR-SP o ratas transgénicas para los genes de la renina y del angiotensinógeno, y en pacientes con hipertensión esencial (Ruiz-Ortega y cols, 2006). Por otra parte, en aorta de ratas SHR y tejidos de animales hipertensos la expresión de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β , IL6, TNF- α está aumentada (Sanz-Rosa y cols., 2004). La AngII también regula la producción de citoquinas y quimiocinas que van a jugar un papel fundamental en el reclutamiento de células inmunes en el endotelio vascular. La infusión de AngII va a incrementar los niveles TNF- α y de IL-6 a nivel renal y en células vasculares. Además, AngII aumenta los niveles de MCP-1, de osteopontina, que es un factor quimiotáctico de macrófagos y de

RANTES (quimiocina regulada sobre activación, célula T normal expresada y secretada). Bloqueantes de SRA disminuyen la expresión de quimiocinas y citoquinas en modelos experimentales de enfermedad renal y vascular (Suzuki y cols, 2003; Sanz-Rosa y cols., 2004; Ruiz-Ortega y cols., 2006).

Entre los mecanismos moleculares que están implicados en la regulación de esta respuesta inflamatoria, destacan mecanismos redox sensibles, la activación de proteínas kinasas como Rho, y la activación de NFκB. La AngII, va a estar implicada en el desarrollo de todos estos mecanismos. Los procesos redox sensibles incluyen expresión de moléculas proinflamatorias, activación de factores de transcripción redox sensibles (NFκB, AP-1), transactivación de EGF-receptor, activación de kinasas redox sensibles y, además, participan en el remodelado vascular. En células musculares lisas, AngII activa NAD(P)H oxidasa, aumentando las ROS como $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 que van a regular, como hemos visto, la expresión de genes proinflamatorios (Touyz, 2004). AngII participa en la activación de la proteína quinasa Rho; la inhibición de esta proteína mejora el daño renal, disminuye la infiltración celular y la expresión de MCP-1 o TNF-α, indicando que esta proteína posee un importante papel en la regulación de los procesos inflamatorios (Ruiz-Ortega y cols., 2006). El NFκB es considerado el principal factor de transcripción mediador de la respuesta inflamatoria (Barnes y Karin, 1997). El daño renal y vascular inducido por la hipertensión, ha sido asociado a un aumento en la actividad de NFκB; los bloqueantes del SRA mejoran ese daño vascular y disminuyen la actividad de NFκB. Además, se ha observado que la expresión de NFκB está aumentada en aorta de ratas SHR y tejidos de animales hipertensos, y disminuye cuando se bloquea el

receptor AT_1 (Tummala y cols., 1999; Pueyo y cols., 2000; Serrano y cols., 2001; Sanz-Rosa y cols., 2004). La inhibición de NF κ B en modelos de hipertensión como en las ratas que sobreexpresan los genes del SRA humanos, mejora el daño de órganos y disminuye la presión arterial (Müller y cols., 2000). Como ya se ha comentado, la activación del NF κ B por la AngII es dependiente tanto de AT_1 como de AT_2 , y la respuesta inflamatoria se revierte solamente si ambos receptores están bloqueados (Esteban y cols., 2004). La transcripción de las isoformas inducibles de la NOS y la COX, que dependen de la actividad de NF κ B (Beswich y cols., 2001), y cuyos derivados participan en la regulación del tono vascular, también está incrementada con la hipertensión. Se ha descrito que esta incrementada expresión puede ser modulada por la acción del SRA (Manucha y cols., 2004). Por otra parte, algunos estudios, sugieren que la ET-1 podría ser un importante mediador en el proceso inflamatorio crónico de la pared vascular (Virdis y Schiffrin, 2003).

Objetivos

Con la hipertensión se ha descrito la existencia de un estado inflamatorio crónico con elevados niveles sanguíneos de citoquinas proinflamatorias (Wu y cols., 1996; Chou y cols., 1998; Virdis y Schiffrin, 2003). Asimismo, se ha descrito una incrementada actividad y expresión de las proteínas iNOS y COX-2 (Chou y cols., 1998; García-Cohen y cols., 2000; Briones y cols., 2000; 2002a) en diversos lechos vasculares. Por otra parte, existe una gran cantidad de estudios que apoyan la hipótesis de que la AngII pueda estar involucrada en el proceso inflamatorio desarrollado con la hipertensión (Touyz y Schiffrin, 2000; Virdis y Schiffrin, 2003; Suzuki y cols., 2003), posiblemente a través de la producción de especies reactivas de oxígeno.

El objetivo general de nuestro trabajo es estudiar a nivel vascular, los mediadores inflamatorios derivados de la inducción de enzimas como la COX-2 e iNOS, y las especies reactivas de oxígeno, así como su posible papel en las alteraciones funcionales que ocurren en la hipertensión y la implicación de la AngII y de los $O_2^{\cdot-}$ en dichas alteraciones.

Los objetivos concretos de este trabajo han sido:

1. Estudiar si la hipertensión altera la participación de derivados de iNOS, COX-2 y de especies reactivas de oxígeno en las respuestas vasculares al agonista α -adrenérgico fenilefrina.

2. Determinar el papel del sistema renina-angiotensina en la participación de prostanoides contráctiles derivados de COX-2 en las respuestas vasculares de animales normotensos e hipertensos

3. Determinar el papel del estrés oxidativo en la participación de prostanoïdes contráctiles derivados de COX-2 en las respuestas vasculares de animales normotensos e hipertensos.

Materiales y Métodos

Para llevar a cabo este estudio, se utilizaron segmentos arteriales de aorta torácica de ratas macho SHR (ratas espontáneamente hipertensas) y su control normotenso WKY (Wistar Kyoto), criadas en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Se utilizaron, además, ratas de ambas cepas tratadas con el antagonista del receptor AT_1 de la AngII, losartán, o con el fármaco análogo de la SOD, tempol. El día del experimento, los animales fueron sacrificados por decapitación y desangrados. Inmediatamente después, se extrajo la aorta torácica y se introdujo en una solución de Krebs-Henseleit (KH) a 4° C oxigenada con una mezcla de 95 % O_2 y 5 % de CO_2 (pH= 7,4), donde se limpió del tejido adiposo. La composición del KH fue la siguiente: NaCl 115 mM; KCl 4,6 mM; $CaCl_2$ 2,5 mM; KH_2PO_4 1,2 mM; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,2 mM; $NaHCO_3$ 25 mM; Glucosa 11,1 mM; Na_2EDTA 0,01 mM.

La respuesta contráctil a fenilefrina se estudió en experimentos de reactividad vascular. La expresión de las proteínas iNOS y COX-2 se analizó mediante técnicas de Western-blot y de inmunofluorescencia. La medida de la cantidad de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de COX-2 se analizó por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real cuantitativa (PCR-RT). La medida de $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 y 8-isoprostanos se realizó mediante enzoinmunoensayo con kits comerciales. Para cuantificar la producción de $O_2^{\cdot -}$, se utilizaron los métodos de determinación de la quimioluminiscencia producida por lucigenina y de la fluorescencia producida por la oxidación del dihidroetidio (DHE). El nivel de peroxidación lipídica se determinó por la cuantificación de

malondialdehído (MDA) en plasma, y el estado antioxidante total y los niveles de H_2O_2 en plasma se determinaron con *kits* comerciales.

1. Grupos de animales y tratamientos

Se utilizaron los siguientes grupos de ratas de 24 semanas de edad:

I) Ratas WKY

II) Ratas SHR

III) Ratas WKY tratadas con losartán (15 mgr/Kgr/día) durante 12 semanas.

IV) Ratas SHR tratadas con losartán (15 mgr/Kgr/día) durante 12 semanas.

V) Ratas WKY tratadas con tempol (1 mM) durante 17 ± 1 días.

VI) Ratas SHR tratadas con tempol (1 mM) durante 17 ± 1 días.

Los tratamientos con losartán y tempol se realizaron vía oral, para lo cual se disolvieron los fármacos en el agua de bebida. La presión arterial sistólica de estos animales fue medida por pletismografía de la arteria caudal. Las medidas de presión arterial en cada rata se repitieron, al menos, tres veces y se realizaron cada dos semanas durante el tratamiento de losartán y cada 3 días durante el tratamiento del tempol.

2. Reactividad vascular

Para realizar los experimentos de reactividad vascular se empleó el método de Nielsen y Owman (1971). Para ello, la aorta se dividió en segmentos de 4 mm de longitud, aproximadamente. Por la luz de los segmentos se introdujeron dos alambres de acero, uno de los cuales estaba fijo a la pared del baño y el otro, que se desplazaba paralelamente al anterior, estaba unido a un transductor de fuerza

(Grass FT 03C), que se conectaba a su vez con un polígrafo (Grass, modelo RPS7C8A) que registraba los cambios de tensión. Los segmentos vasculares se introdujeron en un baño de órganos que contenía 5 ml de KH a 37 °C, burbujeado continuamente con carbógeno (95 % O₂ y 5 % de CO₂) para alcanzar un pH óptimo de 7,4-7,3 (Fig. 12A). Los segmentos se sometieron a una tensión de 1,5 gr, que se reajustó periódicamente hasta que los segmentos se estabilizaron a dicha tensión al cabo de 60 min, aproximadamente. Una vez llegado a este punto, se administró KCl (75 mM) para comprobar la viabilidad de las arterias. Después de lavar los segmentos con KH a 37 °C y dejar estabilizar durante 30 min, se administró de nuevo KCl (75 mM) para establecer la contracción máxima de cada uno de los segmentos (Fig. 12B).

La presencia de endotelio funcional en segmentos de ratas WKY, se determinó por la capacidad de la acetilcolina (ACh, 10 µM) de relajar los vasos precontraídos (aproximadamente un 50% de la contracción a KCl) con el agonista de receptores α₁ adrenérgicos, fenilefrina (Fig. 12B). Se consideraron segmentos con endotelio aquellos que relajaron, al menos, el 50% del tono previo. En el caso de los segmentos procedentes de ratas SHR, conocida su disfunción endotelial, se consideraron segmentos con endotelio aquellos que relajaron, al menos, entre un 35 y un 40% del tono previo. Después de determinar la presencia de endotelio, se realizaron curvas concentración respuesta a fenilefrina (1 nM-30 µM) en ausencia (curva control) o en presencia de diferentes fármacos. Los fármacos utilizados se administraron 30 min antes de realizar la curva concentración-respuesta a fenilefrina (Fig. 12B). En algunos

segmentos se realizaron también curvas concentración respuesta a ACh (1 nM-30 μ M).

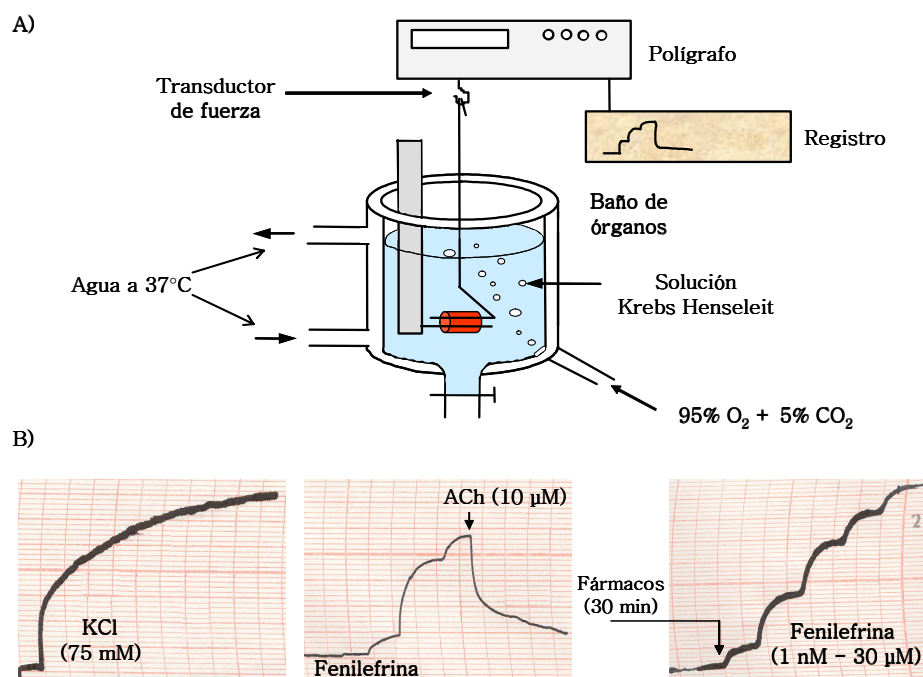


Fig. 12: A) Esquema representativo del baño de órganos donde se realizaron los experimentos de reactividad vascular. B) Experimento representativo del protocolo realizado en los experimentos de reactividad vascular en segmentos de aorta de ratas WKY y SHR. ACh: acetilcolina.

Para analizar el papel del NO en la respuesta contráctil inducida por fenilefrina, se estudió el efecto que sobre la curva dosis respuesta a dicho agonista produjeron: 1) el inhibidor no selectivo de la NOS, L-N^G-nitroarginina metil éster (L-NAME, 100 μ M); 2) los inhibidores selectivos de la iNOS, aminoguanidina (100 μ M) y 1400W (10 μ M), y 3) el inhibidor selectivo de la isoforma nNOS, 7-nitro-indazol (7NI, 10 μ M).

Para estudiar el papel de derivados de COX en la contracción inducida por fenilefrina se estudió el efecto que sobre la curva dosis

respuesta a dicho agonista produjeron: 1) indometacina (1 μ M), inhibidor no selectivo de la COX; 2) NS 398 (1 μ M), inhibidor selectivo de COX-2; 3) SQ 29,548 (1 μ M), antagonista del receptor del TXA₂/PGH₂ y 4) furegrelato (10 μ M) y OKY 046 (10 μ M y 1 μ M), inhibidores de la TXA₂ sintasa.

Para analizar el papel de la expresión de enzimas inducibles, en nuestras condiciones experimentales, sobre las respuestas contráctiles a fenilefrina algunos experimentos se realizaron en presencia de dexametasona, que inhibe la síntesis de proteínas. Para ello, los segmentos vasculares se incubaron en KH con dexametasona (1 μ M) desde el momento en que se extrajeron del animal.

Para estudiar el papel del anión superóxido (O₂^{•-}) y del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en las respuestas contráctiles inducidas por fenilefrina, se preincubaron los segmentos con SOD (150 U/ml) y con catalasa (1000 U/ml), respectivamente. Una vez comprobada la participación de aniones superóxido en las respuestas contráctiles inducidas por fenilefrina, se estudió el papel de las enzimas NAD(P)H oxidasa y xantina oxidasa en la producción de dichos aniones. Para ello, se preincubaron los segmentos con apocinina (0,3 mM) y alopurinol (0,3 mM), inhibidores de la NAD(P)H oxidasa y xantina oxidasa, respectivamente.

Para estudiar la influencia del endotelio sobre la respuesta inducida por fenilefrina, se eliminó mecánicamente este componente vascular de los segmentos arteriales mediante un alambre que se introdujo por la luz del vaso. Después de determinar la viabilidad de los segmentos por la respuesta desarrollada frente a KCl 75 mM, se comprobó la ausencia de endotelio por la incapacidad de la ACh de inducir respuestas vasodilatadoras.

Para analizar el papel de mediadores producidos por la adventicia en las respuestas a fenilefrina, a algunos de los segmentos arteriales se les eliminó la capa adventicial con un tratamiento con colagenasa tipo I (2 mgr/ml), como han descrito previamente González y cols. (2001).

3. Expresión de proteínas por Western blot

La medida de la expresión de las proteínas iNOS y COX-2 por Western blot se realizó en segmentos aórticos de ratas WKY y SHR sin tratar y tratadas con losartán o tempol en, al menos, alguna de las siguientes situaciones experimentales: 1) segmentos recién extraídos del animal (situación basal); 2) segmentos con endotelio en los que se realizó el experimento completo de reactividad vascular (aproximadamente 6 horas después de extraer la arteria del animal, situación 6h); 3) segmentos incubados con dexametasona (1 μ M) desde que las arterias fueron extraídas del animal y durante todo el experimento de reactividad vascular, y 4) segmentos a los que se les eliminó el endotelio (E-) antes de realizar el experimento de reactividad vascular. Los segmentos arteriales se congelaron rápidamente con nitrógeno líquido, una vez extraídos o al finalizar los experimentos de reactividad vascular, y se almacenaron a -70°C hasta el momento de su utilización.

Los segmentos arteriales se homogenizaron en un homogeneizador de vidrio con un “buffer” previamente calentado hasta su ebullición que contenía 10 mM de Tris (pH=7,4), 1% de dodecil sulfato sódico (SDS) y 1 mM de metavanadato sódico, que es un inhibidor de proteasas. Una vez homogeneizada la muestra, se centrifugó durante 10 min a 4°C. La concentración de proteínas en el

sobrenadante obtenido después de la centrifugación, se determinó mediante el método de Lowry (1951) (Bio Rad DC Protein Assay). Se calculó el volumen de muestra necesario para cargar 30 μ gr de proteína, y ese volumen de muestra se mezcló con un volumen igual de “buffer de carga” pH=8 (“buffer” de Laemli), compuesto por 0,5 mM de urea, 0,17 mM de SDS, 39 μ M de ditiotreitól, 0,01 M de Tris y azul de bromofenol. Una vez preparada la muestra, se mantuvo a 99°C durante 4 min.

En un sistema de electroforesis Mini Protean (BioRad Laboratorios, Madrid, España), se polimerizaron dos geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), gel 1 o gel separador y gel 2 o gel concentrador. Los geles se introdujeron en una cubeta llena de “buffer” de electroforesis (25 mM de Tris, 0,2 M de glicina y 1% de SDS), que es un electrolito con una alta capacidad de tamponación, y las muestras se cargaron en el gel concentrador, que contiene 3% de acrilamida, 1,49% de Tris (pH=6,8), 0,1% de SDS, 0,98% de persulfato amónico (APS) y 0,053% de Temed. Después de cargar las muestras se sometieron a una electroforesis aplicando una corriente de intensidad constante de 80 mV entre dos electrodos, que hizo que las muestras pasaran por el gel concentrador primero y el gel separador después. El gel separador contenía 4,6% de Tris (pH=8,8), 0,1% de SDS, 3,4% de glicerol, 0,038% de APS, 0,033% de Temed y una concentración de acrilamida de 7,5%.

Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF Transfer membrana, Hybond P, Amersham Internacional plc, Little Chalfont, Reino Unido) previamente activada con metanol. El gel, la membrana de PVDF y varias láminas de papel Whatman se colocaron en un sistema “sandwich”, inmersos

en un “buffer” de transferencia dentro de un tanque de transferencia (Mini-Protean II, Módulo de Transferencia, BioRad), al que se aplicó una corriente de 230 mA durante toda la noche. El “buffer” de transferencia está compuesto por 25 mM de Tris, 190 mM de glicina, 20% de metanol y 0,05% de SDS.

Una vez finalizada la transferencia, se incubaron las membranas durante 60-90 min en una solución de lavado (10 mM de Tris, 100 mM de NaCl, 0,1% de Tween 20) con 5% de leche desnatada en polvo; de esta forma se evita la unión inespecífica de reactivos no inmunológicos. A continuación se incubaron las membranas durante 1 hora con el anticuerpo primario de iNOS (anticuerpo monoclonal de ratón anti-iNOS, 1:10000, Transduction Laboratorios, Lexington, Reino Unido), de COX-2 (anticuerpo policlonal de conejo anti-COX-2, 1:1000, Cayman Chemical Ann Arbor, MI, USA) o de α -actina (anticuerpo monoclonal de ratón anti- α -actina, 1:3000000, Sigma Chemical, CO, St Louis, USA). La expresión de α -actina se usó para corregir la expresión de iNOS y COX-2 en cada muestra. Estos anticuerpos se diluyeron en la solución de lavado con 5% de leche desnatada en polvo. Después de la incubación, se realizaron 4 lavados sucesivos de las membranas con solución de lavado. A continuación las membranas se incubaron durante 1 hora con el correspondiente anticuerpo secundario, que será anticuerpo IgG anti-ratón (1:2000, Stressgen, Victoria, Canadá) cuando las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios de iNOS y α -actina, o anticuerpo IgG anti-conejo (1:2000, Bio-Rad) si el anticuerpo primario con el que se incubaron las membranas era de COX-2. Ambos anticuerpos secundarios están conjugados con peroxidasa de rábano. Las membranas se lavaron de nuevo y el inmunocomplejo se detectó

mediante una reacción de quimioluminiscencia peroxidasa de rábano/luminol aumentada (ECL Plus, Amersham Internacional plc). Las membranas se expusieron a una película (Hyperfilm ACL, Amersham Interntional plc), que se reveló y las señales del inmunoblot se cuantificaron usando un programa informático, NIH Image V1.56 para Macintosh.

En este estudio, la expresión de iNOS, COX-2 y α -actina se detectó en la misma membrana. Se usó como control positivo de iNOS y COX-2 un homogeneizado de macrófagos de ratón activados con IL-1 β .

4. Inmunofluorescencia

La expresión de COX-2 se determinó, además, por inmunofluorescencia en cortes transversales de segmentos de aorta de ratas WKY y SHR recién extraídos del animal (condiciones basales) y tras la realización de las curvas concentración-respuesta a fenilefrina (6 horas después de la extracción, aproximadamente). Para ello, los segmentos se fijaron con paraformaldehído 4% (PFA en 0,2 M PBS, pH: 7,2-7,4) durante 2 horas, aproximadamente. Después, se realizaron tres lavados consecutivos de 10 min con PBS 0,1 M y por último, se introdujeron en una solución de PBS 0,1 M + sacarosa 30% durante 1,5 horas. A continuación, los segmentos se sumergieron en medio de montaje "OCT tissue-tek" (Sakura Finetek Europe, Holanda) hasta que el medio penetró uniformemente dentro del vaso. Finalmente, las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -70°C hasta el día del experimento.

Se obtuvieron cortes transversales (10 μ m de grosor) con un criostato y se montaron sobre portaobjetos gelatinados. Después de

un periodo de secado de aproximadamente 2 horas a 37 °C, se lavaron los portaobjetos con PBS 0,1 M y se bloquearon con PBS 0,1 M, Tween 20 0,3% y BSA 5% durante 1 hora a 37°C, para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo. Tras el bloqueo, las secciones se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-COX-2 (1:200 Cayman Chemical) y/o un anticuerpo monoclonal anti-vimentina (1:100, Sigma Chemical) durante 1 hora a 37°C. A continuación, se realizaron tres lavados de 10 min con PBS 0,1 M y se incubaron con los anticuerpos secundarios, anti-conejo IgG (1:200) y/o anti-ratón IgG (1:200) conjugados con Alexa 594 y Alexa 488 (Molecular Probes, Leiden, Holanda), respectivamente, durante 1 hora a 37°C. Los anticuerpos se diluyeron en PBS 0,1 M, Tween 20 0,3% y BSA 2% y todas las incubaciones se llevaron a cabo en una cámara húmeda. Tras la incubación con los anticuerpos secundarios, las muestras se lavaron 3 veces durante 10 min con PBS 0,1 M y, a continuación, se incubaron con el colorante nuclear Hoëchst 33342 (0,01 mgr /ml) (Sigma) durante 15 min a temperatura ambiente.

La fluorescencia se visualizó con un microscopio confocal invertido Leica TCS SP2 con un objetivo de inmersión x20 y/o x40. El componente autofluorescente de la elastina de la pared arterial y el anticuerpo conjugado con Alexa 488 fueron visualizados con $\lambda_{exc}=488$ nm y detectados con $\lambda_{em}=490-535$ nm; el anticuerpo conjugado con Alexa 594 fue visualizado con $\lambda_{exc}=543$ nm y detectado con $\lambda_{em}=600-700$ nm, y los núcleos teñidos con Hoëchst 33342 fueron visualizados con $\lambda_{exc}=351-364$ nm y detectados con $\lambda_{em}=400-500$ nm.

La especificidad de la unión se evaluó mediante la omisión del anticuerpo primario y el mismo procesamiento de la muestra. En estas

condiciones, no se observó tinción en la pared vascular en ninguna de las situaciones experimentales.

5. Expresión de ARNm por PCR-RT

La cuantificación de ARNm de COX-2 se llevó a cabo en segmentos de aorta de ratas WKY y SHR sin tratar y tratadas con losartán o tempol en segmentos de aproximadamente 2 cm de longitud en las siguientes condiciones experimentales: 1) recién extraídos del animal y 2) preincubados durante 6 horas en KH a 37°C, en las mismas condiciones que se realizó el experimento completo de reactividad vascular. Los segmentos se congelaron con nitrógeno líquido y se mantuvieron a -70°C hasta el día de su procesamiento.

Para llevar a cabo la extracción del ARNm de la muestra, se homogeneizaron las aortas con trizol (Invitrogen Life Technologies, Philadelphia, PA, USA), un “buffer” específico de aislamiento de ARNm. Se centrifugaron las muestras a 12000 g durante 10 min a 4°C y se recogió el sobrenadante, al que se le añadió cloroformo. La mezcla se centrifugó de nuevo a 12000 g durante 15 min a 4°C. La fase acuosa se recogió y se añadió isopropanolol para precipitar el ARNm. Después de incubar la mezcla a temperatura ambiente durante 20 min, se centrifugó de nuevo a 12000 g, durante 30 min a 4°C. El precipitado obtenido se lavó con etanol 75 %, y después se mantuvo en agua bidestilada-0,1 % dietilpirocarbonato, que inactiva ribonucleasas.

La cuantificación del ARN total se calculó midiendo la absorbancia a 260 nm. A continuación, 1 µgr del ARNm total tratado con ADNasa I fue retrotranscrito a ADNc usando un kit comercial (High Capacity cDNA Archive Kit, Applied Biosystems, Foster City,

CA, USA). El protocolo se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones comerciales en 50 µl de volumen de reacción. La mezcla se procesó en un termociclador durante 10 min a 25°C y 2 horas a 37°C. Los ADNc obtenidos se mantuvieron a -20°C.

10 µgr del ADNc se añadieron a la mezcla de reacción de PCR-RT (Taqman Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems). Se utilizaron cebadores para amplificar el gen de COX-2 (Rn00568225_m1, Applied Biosystems) y cebadores para amplificar el gen de la β_2 microglobulina (Rn00560865_m1, Applied Biosystems), como control interno de cada muestra. La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo en un sistema de detección de secuencia ABI prism 7700 (Applied Biosystems), con las siguientes condiciones: 50°C 2 min, 95°C 10 min, 95°C 15 min. durante 40 ciclos y 60°C 1 min. Las muestras se realizaron por duplicado.

6. Cuantificación de la producción de Prostaglandina $F_{2\alpha}$, Prostaciclina y 8-isoprostano por enzimoimmunoensayo

La producción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y de PGI_2 fue evaluada por la cuantificación de sus metabolitos estables 13,14-dihidro-15-ceto $\text{PGF}_{2\alpha}$ y 6-ceto $\text{PGF}_{1\alpha}$, respectivamente. La cuantificación se realizó mediante enzimoimmunoensayo con un kit comercial de Cayman Chemical en el caso de 13,14-dihidro-15-ceto $\text{PGF}_{2\alpha}$ y 8-isoprostanos y con un kit comercial de R&D Systems (Abingdon, Oxon, Reino Unido) en el caso de 6-ceto $\text{PGF}_{1\alpha}$. Estas medidas se realizaron en el medio KH donde se realizó la curva concentración respuesta a fenilefrina, en ausencia y presencia de NS 398 (1 µM). Estos medios se congelaron a -70°C hasta el momento de su utilización.

El ensayo está basado en la competición entre el prostanoide presente en la muestra que se quiere analizar y el mismo prostanoide conjugado a un enzima y cuya concentración es conocida. La enzima conjugada con el prostanoide reacciona con uno de los reactivos comerciales, dando lugar a un compuesto que se puede leer a una longitud de onda de 405–420 nm; de ese modo se va a poder realizar la cuantificación (Fig. 13). Para determinar la concentración de cada una de las muestras, se extrapolaron los resultados de densidad óptica en la curva-patrón realizada durante el experimento.



Fig. 13: Esquema representativo del proceso del enzoinmunoensayo.

7. Cuantificación de la producción de anión superóxido

La medida de $O_2^{\cdot -}$ se llevó a cabo en segmentos de aorta de ratas WKY y SHR por dos técnicas, quimioluminiscencia producida por lucigenina y fluorescencia producida por la oxidación del dihidroetidio (DHE).

7.1. Quimioluminiscencia producida por lucigenina

La lucigenina (nitrato de bis-N-metilacridinio) es un compuesto aromático que puede reducirse por $O_2^{\cdot -}$ y producir, así, la emisión de luz que puede ser detectada en un luminómetro. Para llevar a cabo el experimento, se utilizaron segmentos de aproximadamente 2 cm de longitud de aorta limpios de tejido adiposo. Dichos segmentos se incubaron durante 30 min a 37°C en una solución fisiológica KH-HEPES modificado con la siguiente composición: NaCl 119 mM, $MgSO_4$ 1 mM, KCl 4,6 mM, H_2KPO_4 0,4 mM, $NaHCO_3$ 5 mM, $Ca Cl_2$ 1,2 mM, HEPES 20 mM, Glucosa 11,1 mM, pH 7,4. A continuación, los segmentos fueron transferidos a un tubo que contenía 1 ml de KH-HEPES y 250 μM de lucigenina, y se tomaron medidas en un luminómetro Optocomp I BG-1 (MGM Instruments Inc, Hamden, CT, USA) cada 30 segundos durante 10 min. Después se dejaron secar los segmentos durante un día a 50°C antes de de pesarlos para expresar los resultados con respecto a su peso seco. Los datos fueron calculados como la diferencia de unidades de luz relativas (ULR) registradas en presencia y en ausencia de segmento.

7.2. Fluorescencia producida por la oxidación del dihidroetidio

El DHE es un derivado de etidio que al oxidarse por acción del $O_2^{\cdot -}$ se intercala entre el ADN de las células, emitiendo una

fluorescencia roja. Así, con este método se puede analizar la producción “in situ” de O_2^- en segmentos de aorta. Después de extraer los segmentos del animal y limpiarlos, se mantuvieron en KH + sacarosa al 30% durante 1 hora. A continuación se congelaron en medio OCT tissue-tek (Sakura) y se mantuvieron las muestras a -70°C hasta el día del experimento. Algunos segmentos se preincubaron durante 30 minutos con apocinina (0,3 mM) para determinar el papel de la NAD(P)H oxidasa en la producción de O_2^- .

Se realizaron cortes transversales de aorta de 10 μm de grosor con un criostato, que se recogieron en portaobjetos gelatinados y se secaron en una estufa a 37°C durante 1,5 horas. Después, se realizó un lavado de los portaobjetos con KH-HEPES y se incubaron durante 30 minutos a 37°C en primer lugar con KH-HEPES y a continuación con KH-HEPES conteniendo DHE 2 μM , 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda.

La fluorescencia emitida se visualizó con un microscopio confocal Leica TCS SP2. El componente autofluorescente de la elastina de la pared arterial fue visualizado con $\lambda_{\text{exc}}=488$ nm y detectado con $\lambda_{\text{em}}=490-535$ nm, y el etidio unido a los núcleos de las células visualizado con $\lambda_{\text{exc}}=546$ nm y detectado con $\lambda_{\text{em}}=600-700$ nm.

8. Medida de malondialdehído en plasma

Los radicales libres atacan a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y lipoproteínas, transformándolos en ácidos grasos peroxidados, los cuales sufren un acortamiento de su cadena lateral liberando MDA, de tal manera que su concentración sérica es proporcional a la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados

oxidados y, por lo tanto, un buen indicador de peroxidación lipídica. Los niveles de MDA plasmáticos fueron medidos por un ensayo modificado del ácido tiobarbitúrico (TBA) (Rodríguez-Martínez y Ruiz-Torres, 1992). Para ello, el plasma fue mezclado con ácido tricloroacético (20%) en 0,6 M HCl (1:1, v/v), y los tubos se mantuvieron en hielo durante 20 min para precipitar los componentes del plasma y evitar posibles interferencias. Las muestras se centrifugaron a 1500 g durante 15 min antes de añadir al sobrenadante TBA (120 mM en Tris 260 mM, pH 7) (Sigma) en una proporción de 1:5 (v/v); la mezcla se hirvió a 97°C durante 30 min. La reacción entre el MDA y el TBA produce un pigmento estable de color rojo en una proporción 1:2 (MDA:TBA), con un coeficiente de extinción molar de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ en el espectro visible (535 nm). Las medidas espectrofotométricas se realizaron a 20°C.

9. Determinación del estado antioxidante total (TAS) en plasma

El TAS fue medido en plasma usando un *kit* comercial (Total antioxidant status assay kit, Calbiochem-Novobiochem Corp). Este ensayo está basado en la capacidad que tienen los antioxidantes presentes en plasma para inhibir la oxidación del ácido 2,2' azino-bis-[3-etilbenz-tiazolin-6-sulfónico] (ABTS) a ABTS^+ por metmioglobina. La cantidad de ABTS^+ producido puede ser determinada por el análisis de la lectura de la absorbancia a 600 nm.

10. Determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno en plasma

Los niveles de H_2O_2 en el plasma de ratas WKY y SHR tratadas y sin tratar con tempol fueron medidos usando un kit comercial

(Hydrogen Peroxide Colorimetric Assay, Sigma). El tinte naranja de xilenol reacciona con el H_2O_2 de la muestra para dar un color púrpura, cuya intensidad será directamente proporcional a la cantidad de H_2O_2 de la muestra. La concentración de cada una de las muestras se determinó por el análisis de la densidad óptica medida a 550 nm y su extrapolación en la curva-patrón realizada durante el experimento.

11. Expresión de los datos y estadística

Las respuestas contráctiles se expresaron en porcentaje de la contracción previa inducida por KCl (75 mM). Para comparar el efecto de un fármaco sobre las curvas concentración-respuesta a fenilefrina de los segmentos aórticos de las dos cepas, WKY y SHR o de animales tratados o no con losartán o tempol, algunos resultados también se expresaron como porcentaje de la área bajo la curva (dABC) en situación control y experimental. Para ello, se calculó el ABC de cada curva individual en cada caso y la diferencia se expresó en porcentaje del ABC de la correspondiente situación control. La vasodilatación inducida por ACh se expresó como porcentaje de la contracción previa inducida por fenilefrina.

Los datos de expresión de proteínas se expresaron como la relación entre las densidades de las bandas de la proteína a estudiar y de la α -actina. Esa relación se comparó, a su vez, con la situación 6h de segmentos de ratas WKY en el caso de la enzima iNOS, y con la situación basal de segmentos de ratas SHR en el caso de la enzima COX-2.

Los datos de expresión de ARNm se calcularon como la expresión relativa del ARNm en segmentos de un grupo experimental con respecto a la de los segmentos del grupo control con el que se

quiere comparar. Para calcular el índice de expresión relativa con respecto al grupo control se usó el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

La liberación de 13,14-dihidro-15-ceto $\text{PGF}_{2\alpha}$ y de 8-isoprostanos se expresó como nanogramos de prostanoide/gramo de tejido/ml de KH. La liberación de 6-ceto $\text{PGF}_{1\alpha}$ se expresó como miligramos de prostanoide /gramo de tejido/ml de KH.

Los datos de medida de $\text{O}_2^{\cdot-}$ se expresaron como unidades de luz relativas (ULR) por gramo de tejido seco por minuto.

La cantidad de MDA en plasma se expresó en μM y el estado antioxidante total en mM.

Todos los datos se presentan como media \pm error estándar (ES) de la media. El número de experimentos en cada caso corresponde al número de ratas utilizadas. Las diferencias entre las medias se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) con el programa estadístico Prisma, y mediante t test de Student no pareada con el programa estadístico Excel. Se consideró significativo un valor de p menor o igual a 0,05.

12. Fármacos y soluciones

Los productos se prepararon en soluciones concentradas (10 o 100 mM) disueltas en agua bidestilada y conservadas a -20°C . Las soluciones concentradas de indometacina y SQ 29,548 se prepararon en bicarbonato sódico y etanol absoluto, respectivamente, y las soluciones concentradas de NS 398 y alopurinol se prepararon en dimetilsulfóxido. Las soluciones necesarias se prepararon cada día a partir de las soluciones concentradas.

Los productos utilizados han sido:

- 1400W (N-[3-(Aminometil) benzil] acetamidina, dihidrocloruro) (Calbiochem)
- 3',3'',5',5''-Tetrabromofenolsulfoneftaleína, sal sódica (Azul de bromofenol) (Sigma)
- Acetilcolina, hidrocloreuro (Sigma)
- Ácido tiobarbitúrico (4-6-Dihidroxipirimidina-2-tiol) (Sigma)
- Albúmina de suero bovino (Sigma)
- Alopurinol (Research Biochemicals Incorporated, RBI)
- Aminoguanidina, hemisulfato (Sigma)
- Apocinina (Fluka)
- Acrilamida (N, N'-Metilenbisacrilamida 40% solución 37,5:1) (BioRad)
- Catalasa (Sigma)
- Colagenasa tipo I (Worthington)
- Dexametasona 21-fosfato (Sigma)
- Dietilpirocarbonato (Sigma)
- Dihidroetidio (Molecular Probes)
- Dodecil Sulfato Sódico (SDS) (Biorad)
- Furegrelato (Sigma)
- Gelatina (Sigma)
- Glicerol (Sigma)
- HEPES (Sigma)
- Hoëchst 33342 (Sigma)
- Indometacina (Sigma)
- Leche desnatada (Sveltesse, Nestlé)
- L-NAME (N^o- Nitro-L-Arginina metil éster) (Sigma)
- Losartán (generosamente suministrado por Merck)
- Lucigenina (Sigma)
- Metanol (Panreac Química S.A)
- NS 398 (N-(2-ciclohexiloxi-4-nitrofenil) metanosulfonamida) (Calbiochem)
- OCT tissue-tek (Sakura)

Materiales y Métodos

- OKY046 (Ozagrel) (generosamente suministrado por Kissei Pharmaceutical CO)
- Paraformaldehído (Panreac)
- Persulfato Amónico (APS) (Sigma)
- Polioxietileno sorbitán monolaurato (Tween 20) (Biorad)
- SQ 29,548 (Ácido [1S-[1 alfa,2 beta (5Z),3 beta,4 alpha]-7-[3-[[2-[(fenilamino) carbonil]hidrazin]metil]-7-oxabicyclo[2.2.1] hept-2- il]-5-heptenoico) (ICN Ibérica SA)
- Superóxido dismutasa (Sigma)
- Temed (N, N, N', N'-tetrametil-etilenodiamida) (Sigma)
- Tempol (4-Hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidina 1-oxil) (Fluka)
- Tris (Tris (hidroximetil)-aminometano) (BioRad)
- Trizol (Invitrogen Life Technologies)
- Urea (Sigma)
- Vanadato Sódico (Sigma)

Resultados

1. Respuestas vasculares a fenilefrina y acetilcolina

El agonista α_1 adrenérgico, fenilefrina (1 nM–30 μ M) dio lugar a respuestas vasoconstrictoras dependientes de la concentración que fueron similares en segmentos de animales normotensos e hipertensos cuando la respuesta vascular se expresó en mgr netos de tensión arterial. Sin embargo, cuando la respuesta a fenilefrina se expresó en porcentaje de la contracción inducida por K^+ (75 mM), con la finalidad de normalizar las respuestas, éstas resultaron ser ligeramente mayores en los segmentos de animales hipertensos (Fig 14). Los valores en mgr de la respuesta a K^+ fueron de $3100,4 \pm 38,8$ (n=63) y de $2913,1 \pm 48,8$ (n=68) ($p < 0,05$ vs WKY) en segmentos con endotelio de WKY y SHR, respectivamente, y de $3000,0 \pm 96,9$ (n=17) y $3015,8 \pm 106,0$ (n=22) en segmentos sin endotelio de WKY y SHR, respectivamente.

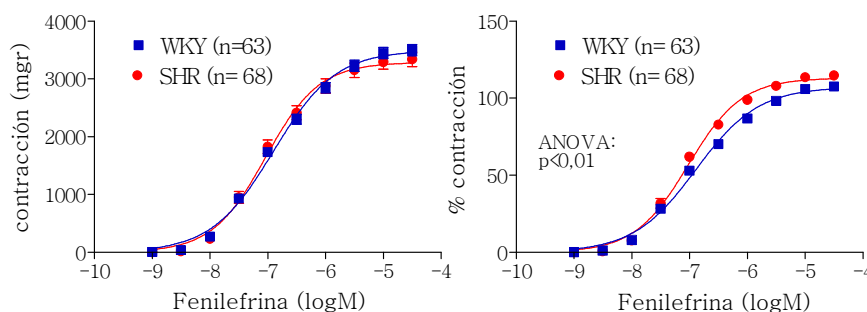


Fig. 14: Curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de aorta de animales WKY y SHR. Los resultados (media \pm ES) de la gráfica de la izquierda están expresados en mg de tensión y los de la derecha en porcentaje de la contracción inducida por K^+ (75 mM). Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

La administración de acetilcolina (1 nM – 30 μ M) a segmentos precontraídos con una concentración de fenilefrina que dio lugar a una respuesta de ,aproximadamente, el 50% de la contracción

inducida por K^+ , originó respuestas vasodilatadoras concentración-dependientes, que fueron mayores en segmentos de animales normotensos que en los de animales hipertensos (Fig. 15). Como ha sido ampliamente descrito, esta respuesta fue dependiente de endotelio, puesto que desapareció al retirar este componente vascular (resultados no mostrados).

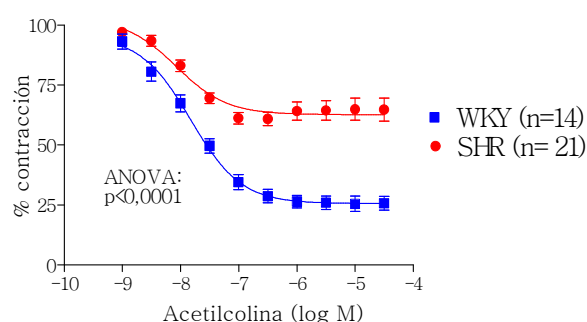


Fig. 15: Curvas concentración-respuesta a acetilcolina en segmentos de aorta de ratas WKY y SHR. Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción previa inducida por fenilefrina. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

1.1. Papel del endotelio en la respuesta a fenilefrina

La retirada del endotelio originó un desplazamiento hacia la izquierda de la curva concentración-respuesta inducida por fenilefrina (Fig. 16). Este desplazamiento fue mayor en segmentos procedentes de animales normotensos, como se puede observar en el análisis de las dABC, lo que indica una mayor modulación endotelial de las respuestas vasoactivas en la cepa normotensa que en la hipertensa.

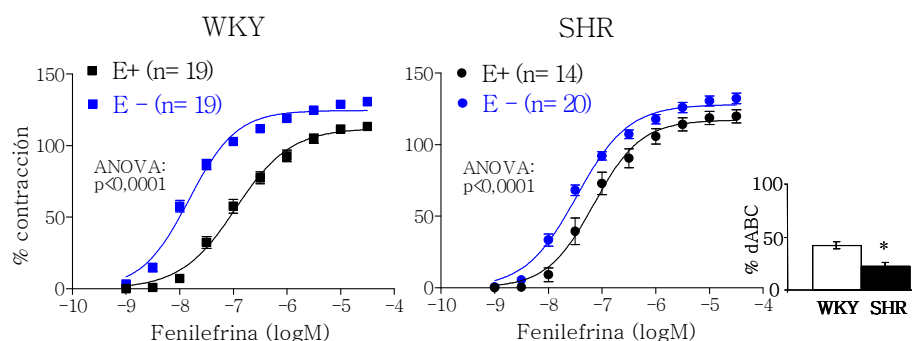


Fig. 16: Curvas concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos con (E+) y sin endotelio (E-) de ratas WKY y SHR. Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ (75 mM). Los histogramas (media \pm ES) muestran las diferencias de área bajo las curvas a fenilefrina (dABC) en ausencia y presencia de endotelio, expresadas en porcentaje del ABC de arterias con endotelio. * $p < 0,0001$ por t de Student no pareada. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

2. Participación del NO sintetizado por iNOS en la respuesta a fenilefrina

La incubación de los segmentos de aorta con el inhibidor no selectivo de la NOS, L-NAME (100 μ M), que compite con el sustrato, L-Arginina, por el sitio de unión al enzima, potenció la respuesta a fenilefrina de forma similar en segmentos procedentes de ambas cepas, como muestran los valores de dABC incluidos en la Fig 17.

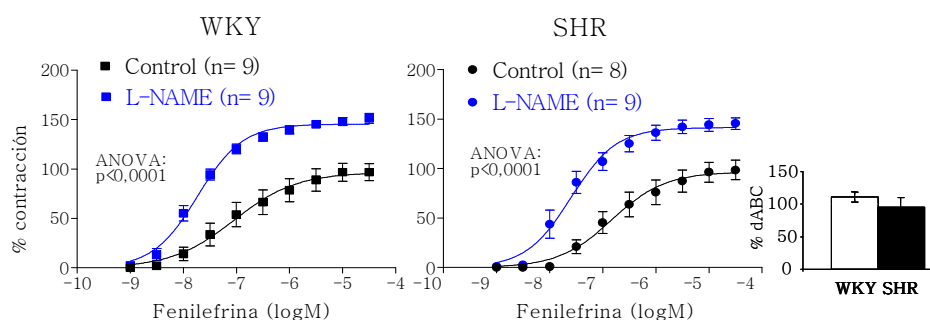


Fig. 17: Efecto de L-NAME (100 μ M) sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de aorta de ratas WKY y SHR. Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ (75 mM) en cada caso. Los histogramas (media \pm ES) muestran las diferencias de área bajo las curvas a fenilefrina (dABC) en presencia y ausencia de L-NAME, expresadas como porcentaje del ABC de arterias control. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

Las alteraciones inflamatorias observadas con la hipertensión, así como la inducción de enzimas como la iNOS, que podría alterar las respuestas vasculares durante un proceso de este tipo, nos llevó a estudiar si el NO sintetizado por la isoforma inducible de la NOS participa en la respuesta a fenilefrina. Por este motivo, realizamos los experimentos en presencia de los inhibidores selectivos de iNOS, aminoguanidina y 1400W. Del mismo modo que L-NAME, la aminoguanidina (100 μ M) incrementó la curva concentración-respuesta a fenilefrina, de forma similar en segmentos de ambas cepas (Fig. 18A). Sin embargo, 1400W (10 μ M), solamente potenció la respuesta inducida por fenilefrina en aorta de ratas WKY (Fig. 18B).

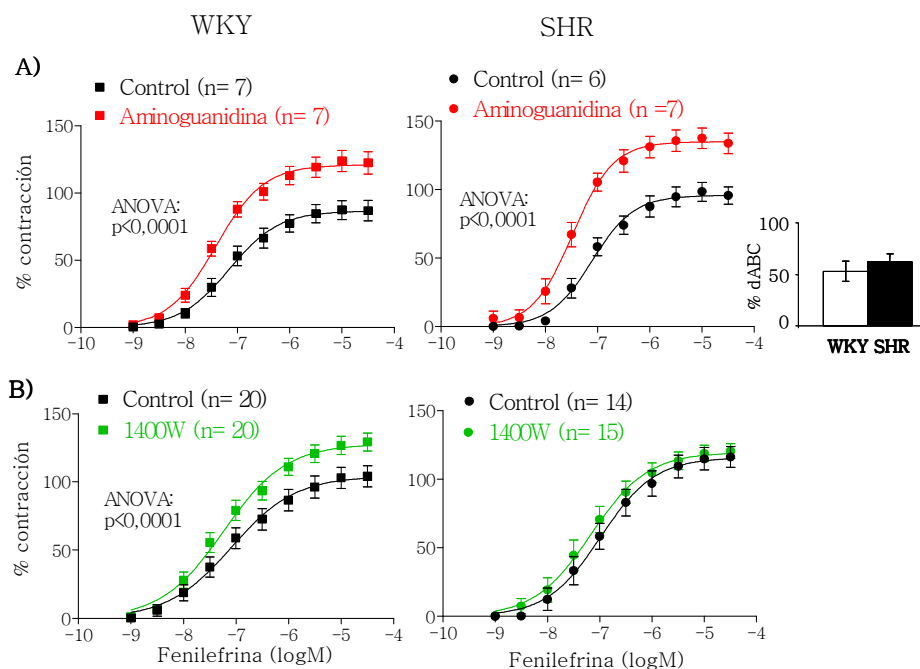


Fig. 18: Efecto de aminoguanidina (100 μ M, A) y 1400W (10 μ M, B) sobre la curva concentración-respuesta inducida por fenilefrina en segmentos de aorta de ratas WKY y SHR. Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ (75 mM). Los histogramas (media \pm ES) muestran las diferencias de área bajo las curvas a fenilefrina (dABC) en presencia y ausencia de aminoguanidina, expresadas como porcentaje del ABC de arterias control. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

Aunque aminoguanidina es un fármaco que se emplea habitualmente como inhibidor de la isoforma inducible de la NOS, se ha descrito que también puede inhibir otras isoformas de esta enzima (Boër y cols., 2000), siendo los valores de IC_{50} de 3,9, 3,2 y 3,1 nM para iNOS, nNOS y eNOS, respectivamente. Así, para estudiar si el efecto potenciador inducido por aminoguanidina era debido a su acción inhibitoria sobre la isoforma neuronal de la NOS, utilizamos el inhibidor selectivo de esta isoforma, 7 nitro-indazol (7NI, 10 μ M). En presencia de este fármaco no se observó modificación de la respuesta a fenilefrina en ninguna de las dos cepas estudiadas (Fig. 19).

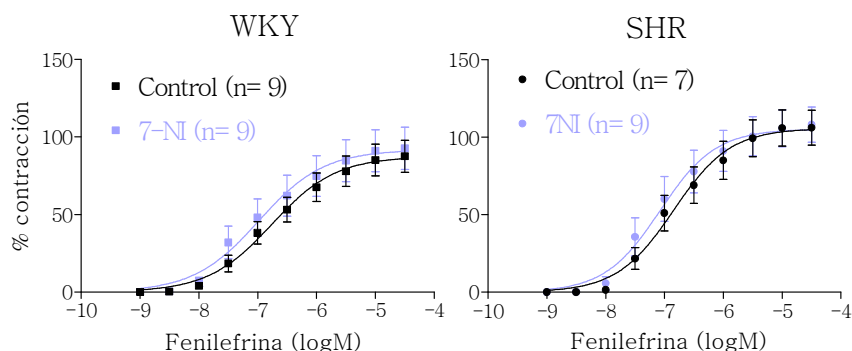


Fig. 19: Efecto de 7NI (10 μ M) sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de aorta de ratas WKY y SHR. Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ (75 mM) en cada caso. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados.

Los resultados empleando inhibidores de la iNOS sugerían la posible participación de NO sintetizado por dicha isoforma inducible en la respuesta a fenilefrina. Para estudiar la posible inducción de esta enzima a lo largo del experimento, segmentos arteriales de ambas cepas se incubaron con dexametasona (1 μ M), inhibidor de la síntesis de proteínas, desde la extracción de la aorta del animal y se mantuvo a lo largo de todo el experimento. En estas condiciones, la contracción inducida por fenilefrina fue inhibida, siendo esta inhibición mayor en segmentos procedentes de ratas SHR (Fig. 20).

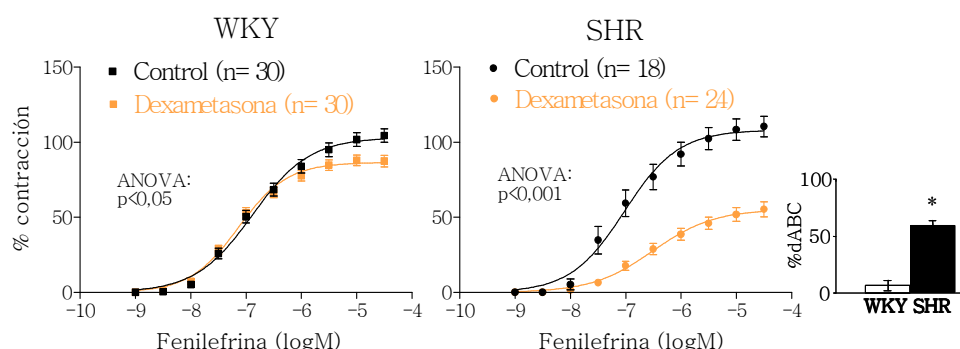


Fig. 20: Efecto de dexametasona (1 μ M) sobre la curva concentración-respuesta inducida por fenilefrina en segmentos de aorta de ratas WKY y SHR. Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ (75 mM). Los histogramas (media \pm ES) muestran las diferencias de área bajo las curvas a fenilefrina (dABC) en ausencia y presencia de dexametasona, expresadas como porcentaje del ABC de arterias control. * $p < 0.0001$ vs WKY por t de Student no pareada. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

Para comprobar si el efecto potenciador de la aminoguanidina y el 1400W sobre la respuesta a fenilefrina era debido a que durante el experimento se producía una inducción de la iNOS, se analizó el efecto de estos fármacos en presencia de dexametasona (1 μ M). En estas condiciones la potenciación de la respuesta contráctil a fenilefrina inducida por aminoguanidina (AG, 100 μ M) disminuyó en segmentos de animales WKY (% dABC, AG = $53,1 \pm 9,7$; dexametasona + AG = $25,4 \pm 7,6$; $p < 0,05$), mientras que en animales SHR se mantuvo la potenciación (% dABC, AG = $62,1 \pm 8,0$; dexametasona + AG = $55,5 \pm 11,1$; $p > 0,05$) (Fig. 21A). Así, en presencia de dexametasona, la potenciación inducida por aminoguanidina (100 μ M) fue mayor en segmentos de animales hipertensos comparada con la observada en los animales normotensos (Fig. 21A). Por otro lado, la dexametasona abolió el

Resultados

efecto producido por 1400W (10 μ M) que se observaba en segmentos de animales normotensos (Fig. 21B).

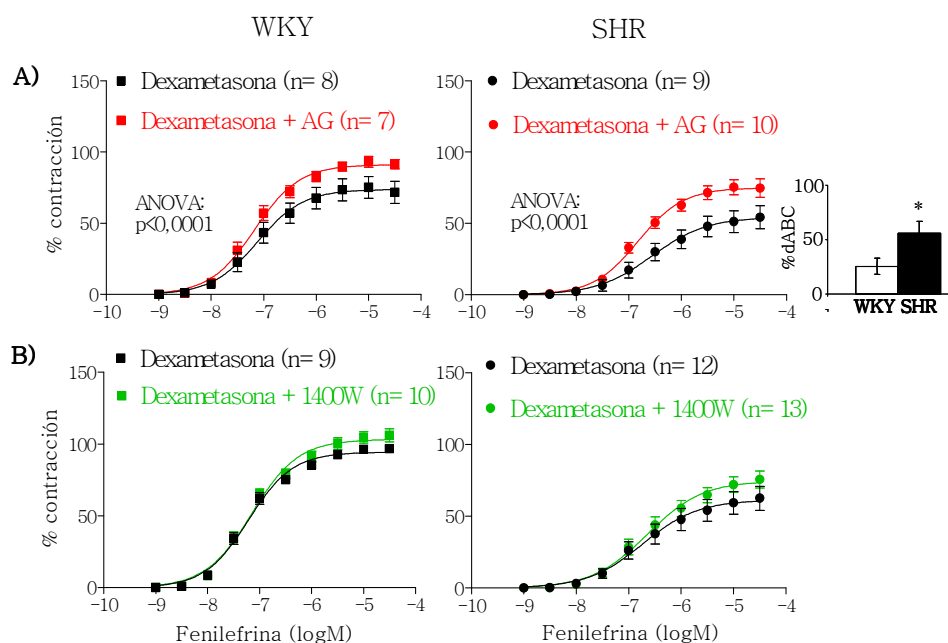


Fig. 21: Efecto de aminoguanidina (AG, 100 μ M, A) y 1400W (10 μ M, B) sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de aorta de WKY y SHR incubados con dexametasona (1 μ M). Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ (75 mM). Los histogramas (media \pm ES) muestran las diferencias de área bajo las curvas a fenilefrina (dABC) en presencia de dexametasona más aminoguanidina y en presencia de dexametasona, expresadas como porcentaje del ABC de arterias con dexametasona. * $p < 0.0001$ vs WKY por t de Student no pareada. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

Para determinar si el NO derivado de iNOS que estaba participando en la respuesta a fenilefrina en animales normotensos era sintetizado en el endotelio, realizamos experimentos en los que analizamos el efecto de 1400W (10 μ M) en segmentos sin endotelio. En estas condiciones, 1400W no modificó las curvas concentración-respuesta a fenilefrina en ninguna de las dos cepas estudiadas (Fig. 22).

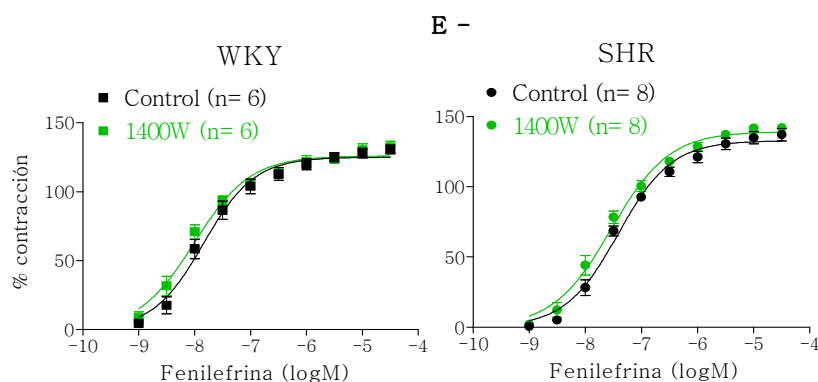


Fig. 22: Efecto del 1400W (10 μ M) sobre la curva concentración–respuesta inducida por fenilefrina en segmentos sin endotelio (E–) de aorta de ratas WKY y SHR. Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ (75 mM) en cada caso. Entre paréntesis se indica el número de animales.

2. 1. Expresión de iNOS

La expresión de iNOS se analizó en segmentos de aorta de ratas WKY y SHR en condiciones basales (inmediatamente después de extraer la arteria del animal) y en segmentos en los que se habían realizado los experimentos de reactividad vascular y que habían estado, por tanto, en KH durante, aproximadamente, 6 horas. En condiciones basales no se detectó expresión de iNOS ni en segmentos de WKY ni de SHR (Fig. 23). Después de realizar los experimentos de reactividad vascular, la expresión de esta proteína se detectó en arterias de ambas cepas, siendo mayor la expresión en arterias de animales hipertensos. Por otra parte, dicha expresión se abolió en segmentos procedentes de ambas cepas tras la eliminación del endotelio o cuando se incubaron con dexametasona (1 μ M) desde que los segmentos arteriales eran extraídos del animal (Fig. 23).

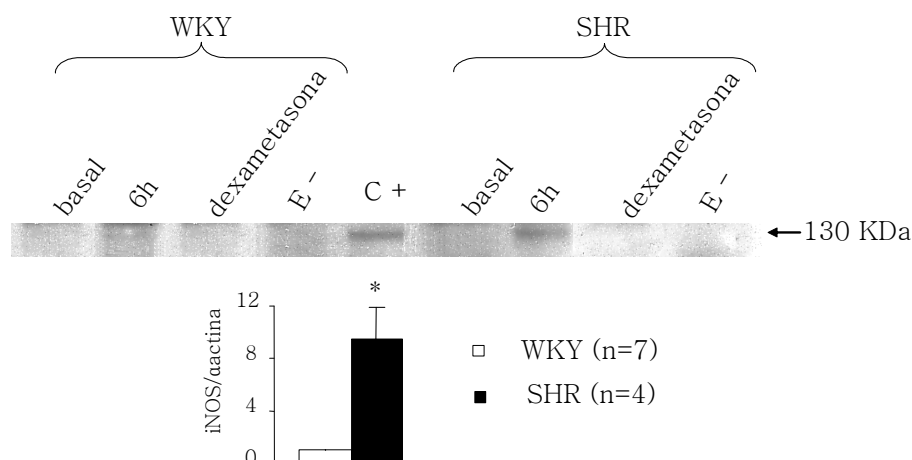


Fig. 23: Resultados del análisis de la expresión de iNOS mediante la técnica de Western Blot en segmentos de aorta de ratas WKY y SHR en las diferentes situaciones experimentales: basal (recién extraídos del animal), 6h (después de realizar los experimentos de reactividad en ausencia de fármaco, al cabo de 6 horas, aproximadamente), después de la incubación con dexametasona (1 μ M) desde que los segmentos fueron extraídos del animal y en segmentos sin endotelio (E-). La parte superior de la figura muestra un blot representativo. Como control positivo (C+) se utilizó homogenado de macrófagos de ratón estimulados con IL-1 β . En la parte inferior se muestran los resultados (media \pm ES) en segmentos control 6h de WKY y SHR; estos resultados se expresan como la relación entre la densidad de las bandas de iNOS y de α -actina en cada caso y dando un valor de 1 a esta relación en los segmentos de WKY en cada blot. * $p < 0,01$ vs WKY por t de Student no pareada. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

Los resultados mostrados hasta ahora parecen indicar que el NO derivado de la isoforma inducible de la NOS, sintetizado en el endotelio vascular, estaría participando en la respuesta a fenilefrina únicamente en segmentos de animales normotensos. Sin embargo, aunque la participación de NO derivado de iNOS es mayor en la cepa normotensa, la expresión de este enzima es mayor en aorta de ratas hipertensas.

3. Participación $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 en la respuesta a fenilefrina

Como ya se ha comentado anteriormente, el estrés oxidativo puede jugar un papel importante en la patofisiología de la hipertensión. Por ello, procedimos a determinar la producción de $O_2^{\cdot-}$ en aorta de ratas WKY y SHR, y a analizar su participación y la de H_2O_2 en las respuestas contráctiles a fenilefrina.

La producción de $O_2^{\cdot-}$ fue mayor en segmentos de animales hipertensos que en segmentos de animales normotensos tanto cuando se determinó su producción por el método de la quimioluminiscencia producida por lucigenina (Fig. 24A) como por el de la fluorescencia emitida por DHE al oxidarse (Fig. 24B).

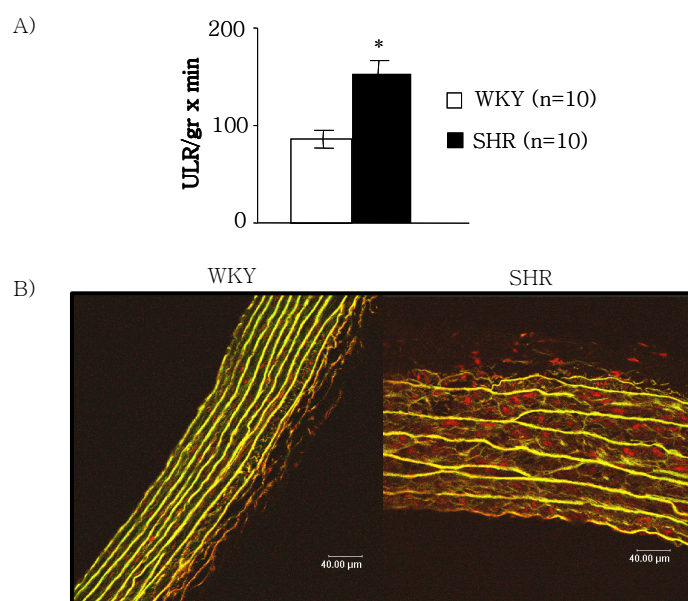


Fig. 24: A) Producción de anión superóxido en segmentos de ratas WKY y SHR cuantificado por quimioluminiscencia producida por lucigenina. Los resultados (media \pm ES) están expresados en unidades de luz relativas (ULR) por gramo de tejido seco y por minuto. * $p < 0,05$ vs WKY por t de Student no pareada. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso. B) Microfotografía representativa de la fluorescencia emitida por dihidroetidio en cortes transversales de aorta de ratas WKY y SHR; (n=8)

Para estudiar la participación de $O_2^{\cdot-}$ en la respuesta a fenilefrina, se realizaron experimentos en presencia de SOD (150 U/ml), que dismuta el anión superóxido a peróxido de hidrógeno. La SOD inhibió la contracción a fenilefrina solo en aorta de SHR (Fig. 25).

Para estudiar la participación del H_2O_2 en la respuesta a fenilefrina, se realizaron experimentos en presencia de catalasa (1000 U/ml), que cataliza la transformación de dos moléculas de H_2O_2 a agua y oxígeno. Catalasa no modificó la respuesta a fenilefrina en ninguna de las dos cepas (Fig 26).

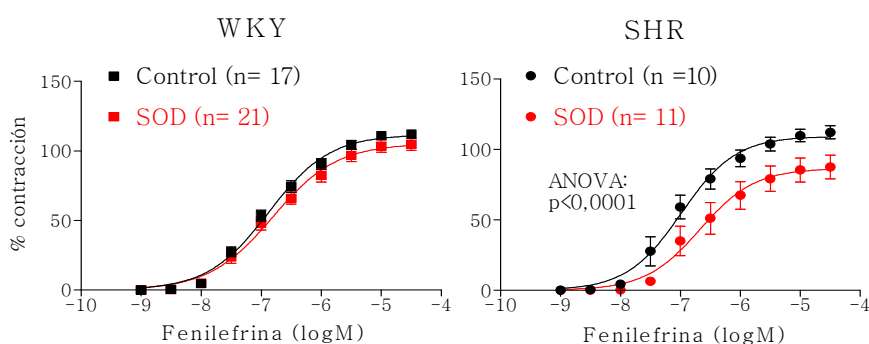


Fig. 25: Efecto de SOD (150 U/ml) sobre la contracción inducida por fenilefrina en segmentos de aorta de ratas WKY y SHR. Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ (75 mM). Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

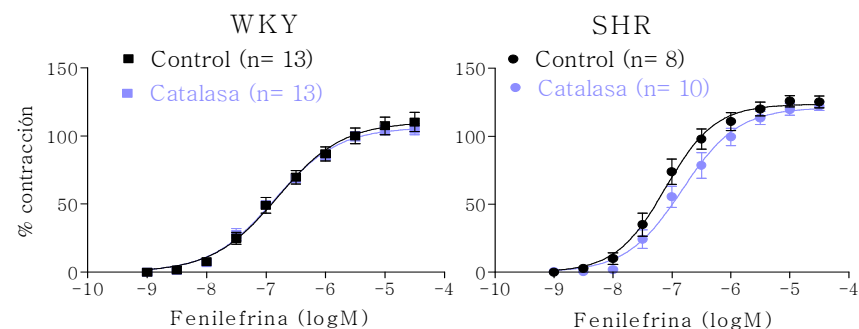


Fig. 26: Efecto de catalasa (1000 U/ml) sobre la contracción inducida por fenilefrina en segmentos de aorta de ratas WKY y SHR. Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ (75 mM). Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

Estos resultados indican que la participación de $O_2^{\cdot-}$ en la respuesta contráctil a fenilefrina está aumentada en aorta de ratas SHR. Para analizar la posibilidad de que el efecto inhibitorio observado con la SOD se deba al H_2O_2 producido por la SOD añadida exógenamente, se preincubaron los segmentos de aorta conjuntamente con SOD (150 U/ml) y catalasa (1000 U/ml) antes de realizar la curva concentración-respuesta a fenilefrina. La catalasa no modificó el efecto inhibitorio de la SOD en segmentos de animales hipertensos (Fig 27), lo que descarta que el efecto de SOD se deba a la producción de H_2O_2 sino, efectivamente, a la eliminación de $O_2^{\cdot-}$.

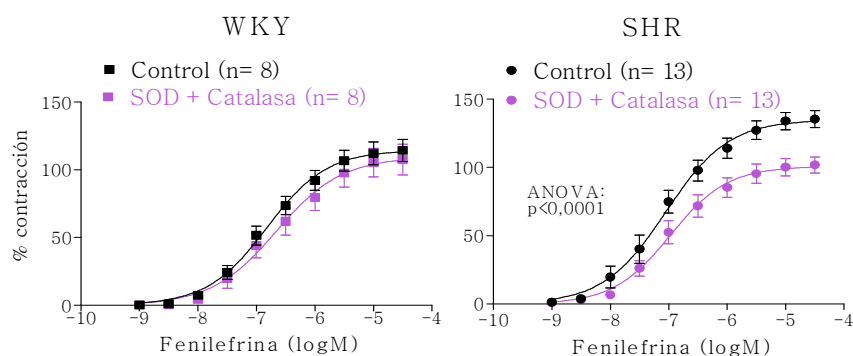


Fig. 27: Efecto de SOD (150 U/ml) más catalasa (1000 U/ml) sobre la contracción inducida por fenilefrina en segmentos de aorta de ratas WKY y SHR. Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ (75 mM). Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

Cuando existe un exceso de $O_2^{\cdot-}$, éste puede reaccionar con el NO para formar otro radical libre, el peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$). Como hemos comentado anteriormente, al analizar la participación del NO derivado de iNOS en las respuestas contráctiles a fenilefrina, observamos una mayor participación de este factor en segmentos de aorta de ratas normotensas; sin embargo, se observó una mayor expresión de iNOS en segmentos de animales hipertensos. La

eliminación del $O_2^{\cdot -}$ por parte de la SOD podría aumentar la disponibilidad de NO derivado de iNOS en segmentos de ratas SHR, y, por tanto, aumentar la participación de este factor vasodilatador, reduciendo así las respuestas contráctiles. Para analizar si la disminución de la respuesta contráctil a fenilefrina en presencia de SOD se debía a una mayor disponibilidad de NO de iNOS, se analizó el efecto del inhibidor de iNOS 1400W (10 μ M) en presencia de SOD. En estas condiciones, no solo se eliminó el efecto inhibitorio observado con SOD en segmentos de ratas hipertensas, sino que además se potenció la respuesta contráctil a fenilefrina en segmentos de aorta de ambas cepas (Fig 28A); la potenciación del efecto de SOD por la administración conjunta con 1400W sobre la respuesta a fenilefrina, fue mayor en segmentos de animales hipertensos (Fig 28B).

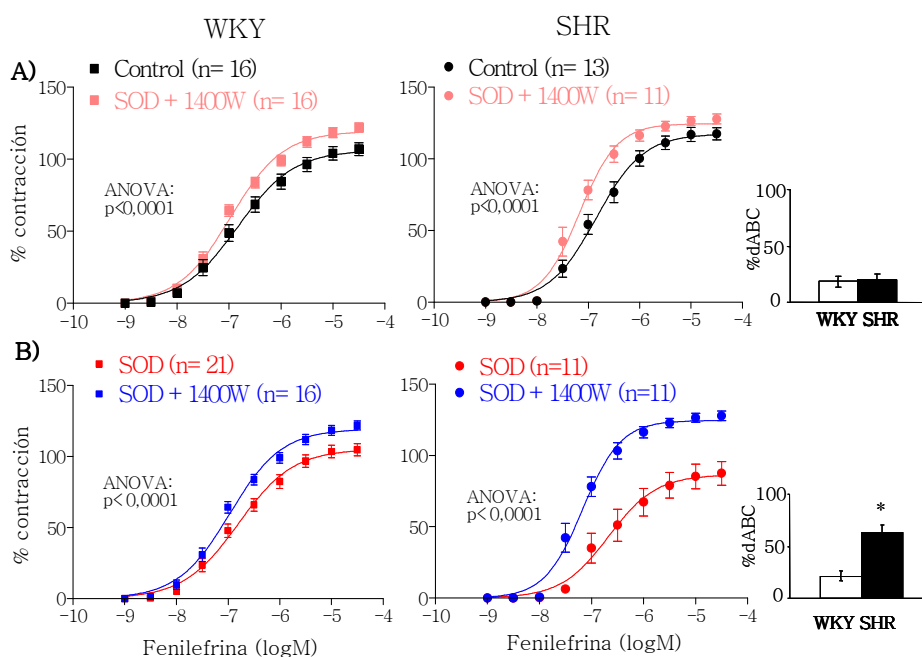


Fig. 28: A) Efecto de SOD (150 U/ml) más 1400W (10 μ M) sobre la contracción inducida por fenilefrina en segmentos de aorta de ratas WKY y SHR. Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ (75 mM). Los histogramas (media \pm ES) muestran las diferencias de área bajo las curvas a fenilefrina (dABC) en presencia y ausencia de SOD + 1400W, expresadas como porcentaje del ABC de arterias control. B) Efecto de 1400W (10 μ M) sobre la contracción inducida por fenilefrina en segmentos de aorta de ratas WKY y SHR tratados con SOD (150 U/ml). Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ (75 mM). Los histogramas (media \pm ES) muestran las diferencias de área bajo las curvas a fenilefrina (dABC) en presencia de SOD + 1400W y en presencia de SOD, expresadas como porcentaje del ABC de arterias en presencia de SOD. * $p < 0.0001$ vs WKY por t de Student no pareada. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

3. 1. Enzimas generadoras de $O_2^{\cdot-}$

De los resultados expuestos anteriormente sugerimos que el $O_2^{\cdot-}$ participa en la respuesta contráctil a fenilefrina en mayor medida en animales hipertensos. Existen distintas fuentes a partir de las cuales se puede obtener esta especie reactiva de oxígeno a nivel vascular, entre ellas la NADP(H) oxidasa y la xantina oxidasa. Para estudiar si el $O_2^{\cdot-}$ provenía de una de estas dos fuentes, preincubamos las arterias con apocinina (0,3 mM) o con alopurinol (0,3 mM), inhibidores de la NAD(P)H oxidasa y de la xantina oxidasa, respectivamente. La apocinina inhibió la respuesta contráctil a fenilefrina en ambas cepas, pero de forma mas acusada en segmentos de aorta de ratas SHR (Fig 29A). Sin embargo, el alopurinol no modificó la respuesta a fenilefrina en ningún caso (Fig 29B).

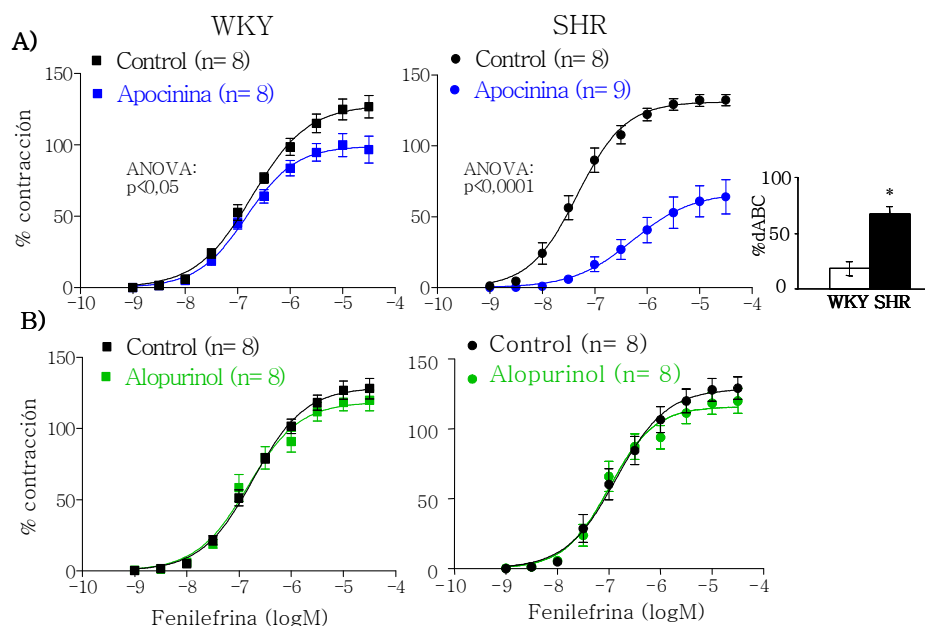


Fig. 29: Efecto de apocinina (0,3 mM, A) y alopurinol (0,3 mM, B) sobre la contracción inducida por fenilefrina en segmentos de aorta de ratas WKY y SHR. Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ (75 mM). Los histogramas (media \pm ES) muestran las diferencias de área bajo las curvas a fenilefrina (dABC) en ausencia y presencia de apocinina, representadas como porcentaje del ABC de arterias control. * $p < 0,0001$ vs WKY por t de Student no pareada. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

Para confirmar el papel de la NAD(P)H oxidasa en la producción de $O_2^{\cdot-}$, se preincubaron segmentos de aorta de ratas WKY y SHR con apocinina (0,3 mM) y se analizó la producción de $O_2^{\cdot-}$ por el método del dihidroetidio. Apocinina disminuyó la producción de anión superóxido en segmentos de animales hipertensos (Fig. 30).

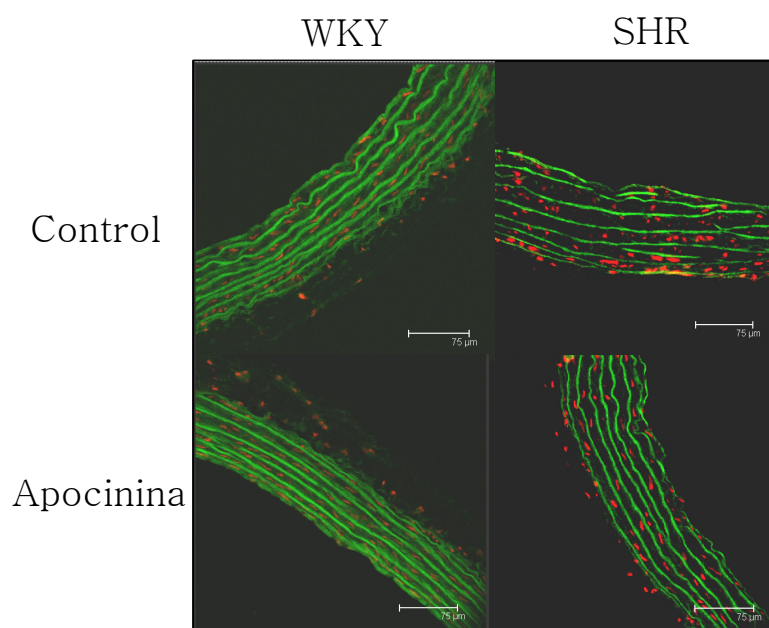


Fig. 30: Microfotografía representativa de la fluorescencia emitida por dihidroetidio en cortes transversales de aorta de ratas WKY y SHR preincubados en ausencia o presencia de apocinina (0,3 mM); (n=4-6).

Los resultados mostrados en este apartado indican que la hipertensión aumenta la producción vascular de $O_2^{\cdot-}$ a partir de la NAD(P)H oxidasa, así como su participación en la respuesta a fenilefrina, probablemente a través de la inactivación del NO.

4. Participación de prostanoïdes sintetizados por COX-2 en la respuesta a fenilefrina

Para estudiar la participación de derivados de la COX en la respuesta a fenilefrina, se realizaron experimentos en presencia de indometacina (1 μ M), que inhibe tanto la isoforma constitutiva de la COX como la inducible. Este fármaco inhibió la contracción a fenilefrina en aorta de WKY y SHR, aunque esta inhibición fue mayor en la cepa hipertensa (Fig. 31).

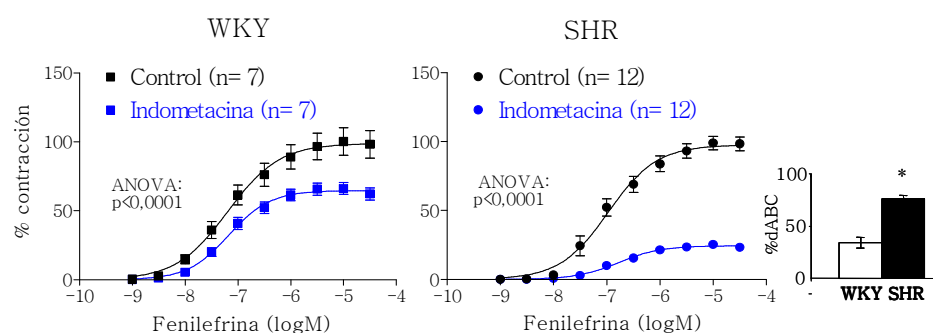


Fig. 31: Efecto de indometacina (1 μ M) sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de aorta de ratas WKY y SHR. Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ (75 mM) en cada caso. Los histogramas (media \pm ES) muestran las diferencias de área bajo las curvas a fenilefrina (dABC) en ausencia y presencia de indometacina, representadas como porcentaje del ABC de arterias control. * $p < 0,0001$ vs WKY por t de Student no pareada. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

Una vez determinada la participación de prostanoïdes contráctiles derivados de la ciclooxygenasa en la respuesta a fenilefrina, y puesto que, como habíamos comentado, el inhibidor de la síntesis de proteínas dexametasona redujo también la respuesta a fenilefrina más en segmentos de animales hipertensos (Fig. 19), se estudió si estos prostanoïdes se sintetizaban a partir de la isoforma inducible de la COX. Para ello, se utilizó un inhibidor selectivo de

esta isoforma, NS 398 (1 μ M). Este fármaco, reprodujo los resultados obtenidos con la indometacina y disminuyó la respuesta contráctil a fenilefrina (Fig. 32) de forma más acusada, en aorta de animales hipertensos que de normotensos.

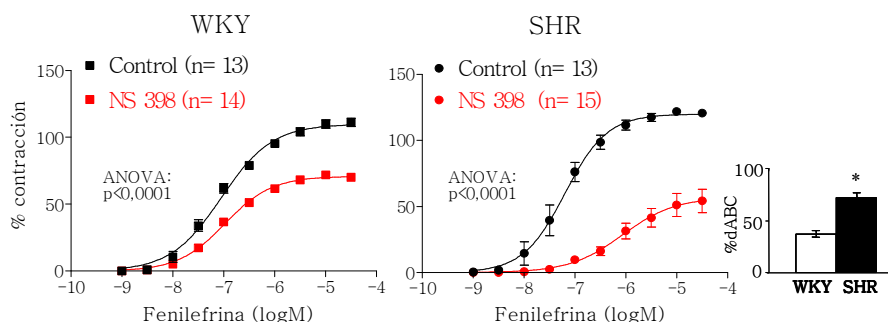


Fig. 32: Efecto de NS 398 (1 μ M) sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de aorta de ratas WKY y SHR. Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K⁺ (75 mM) en cada caso. Los histogramas (media \pm ES) muestran las diferencias de área bajo las curvas a fenilefrina (dABC) en ausencia y presencia de NS 398, representadas como porcentaje del ABC de arterias control. * $p < 0,0001$ vs WKY por t de Student no pareada. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

Para estudiar si los prostanoideos contráctiles que participaban en la respuesta a fenilefrina lo hacían a través de la activación del receptor TP, se utilizó el antagonista de este receptor, SQ 29,548 (1 μ M). De nuevo, este fármaco inhibió la respuesta a fenilefrina en ambas cepas, pero en mayor medida en segmentos procedentes de la cepa hipertensa (Fig. 33).

Para estudiar si la producción de TXA₂ está participando en la respuesta a fenilefrina, se analizó el efecto de dos inhibidores de la tromboxano A₂ sintasa, furegrelato y OKY 046, en dicha respuesta. Ni furegrelato (10 μ M) (Fig. 34A) ni OKY 046 (10 μ M) (Fig 34B) modificaron la curva concentración-respuesta al agonista, lo que descarta la participación de este eicosanoide en dicha respuesta.

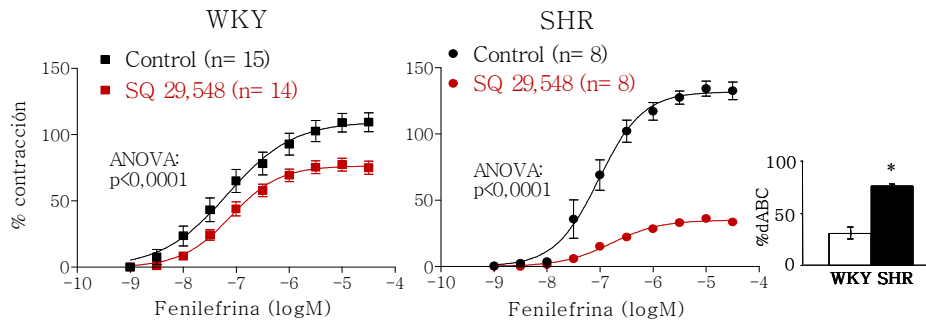


Fig. 33: Efecto de SQ 29,548 (1 μ M) sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de aorta de ratas WKY y SHR. Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ (75 mM). Los histogramas (media \pm ES) muestran las diferencias de área bajo las curvas a fenilefrina (dABC) en ausencia y presencia de SQ 29,548, representadas como porcentaje del ABC de arterias control. * $p < 0.0001$ vs WKY por t de Student no pareada. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

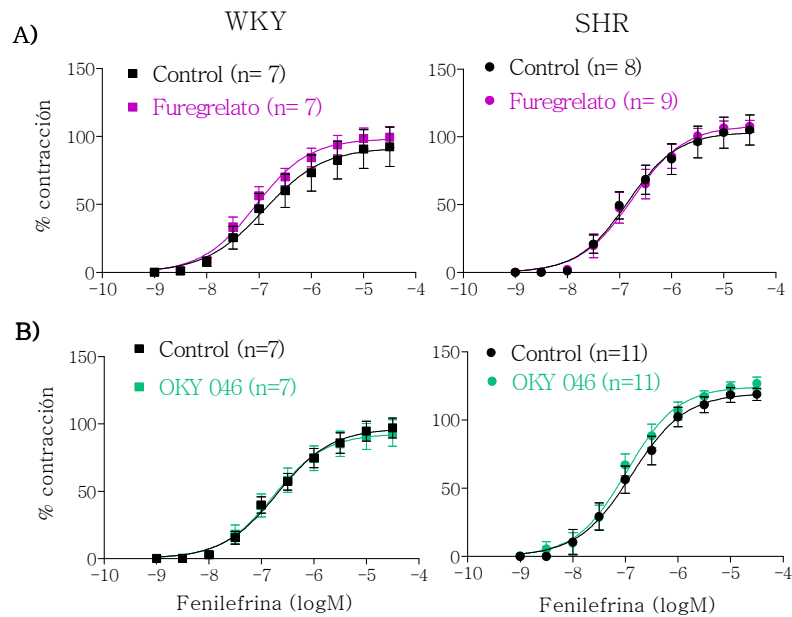


Fig. 34: Efecto de furegrelato (1 μ M, A) y OKY 046 (10 μ M, B) sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de aorta de ratas WKY y SHR. Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ (75 mM). Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

Los resultados obtenidos indicaban que prostanoides contráctiles derivados de COX-2, y que actúan a través de su unión al receptor TP, estaban participando en la respuesta a fenilefrina, y que la hipertensión incrementa esta participación. El hecho de que dexametasona inhibiera la respuesta a fenilefrina en mayor medida en animales hipertensos que normotensos podía hacernos pensar en la inducción de COX-2 a lo largo del experimento. Para comprobar esta hipótesis, analizamos el efecto del inhibidor selectivo de COX-2, NS 398, en segmentos incubados con dexametasona y observamos que el efecto inhibitorio de NS 398 sobre la respuesta a fenilefrina quedó abolido en presencia de dexametasona (Fig. 35).

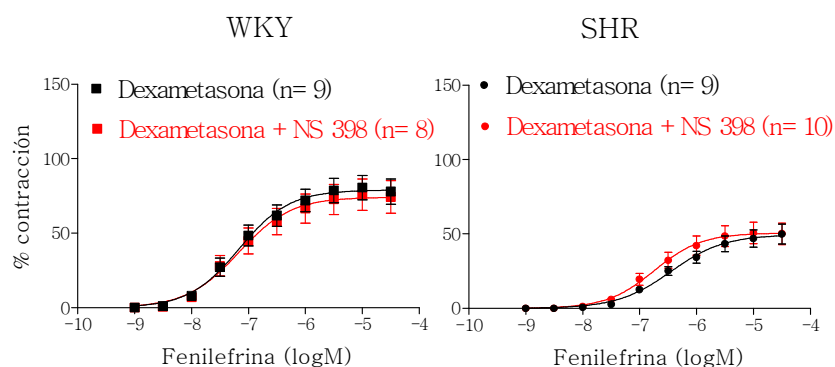


Fig. 35: Efecto de NS 398 (1 μ M) sobre la respuesta inducida por fenilefrina en segmentos de aorta de ratas WKY y SHR incubados durante todo el experimento con dexametasona (1 μ M). Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ (75 mM). Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

4. 1. Expresión de COX-2

Los resultados hasta aquí presentados sugerían que en la respuesta a fenilefrina participaban prostanoïdes contráctiles derivados de COX-2 y, que dicha participación es superior en animales hipertensos. Para comprobar si esta mayor participación se debe a la mayor presencia de esta isoforma en la cepa hipertensa, procedimos a determinarla por diferentes técnicas: expresión del ARNm por PCR-RT cuantitativa y expresión de la proteína por Western blot e inmunofluorescencia.

4.4.1. Expresión de COX-2 por PCR-RT cuantitativa

La expresión del ARNm de COX-2 en condiciones basales fue mayor en aorta de animales hipertensos comparada con sus correspondientes controles normotensos. Tras preincubar los segmentos durante 6 horas (6h) en KH, en condiciones similares a las que teníamos durante la realización de los experimentos de reactividad vascular, la expresión del ARNm se incrementó en ambas cepas, siendo dicha expresión significativamente mayor en la cepa hipertensa (Fig. 36).

Resultados

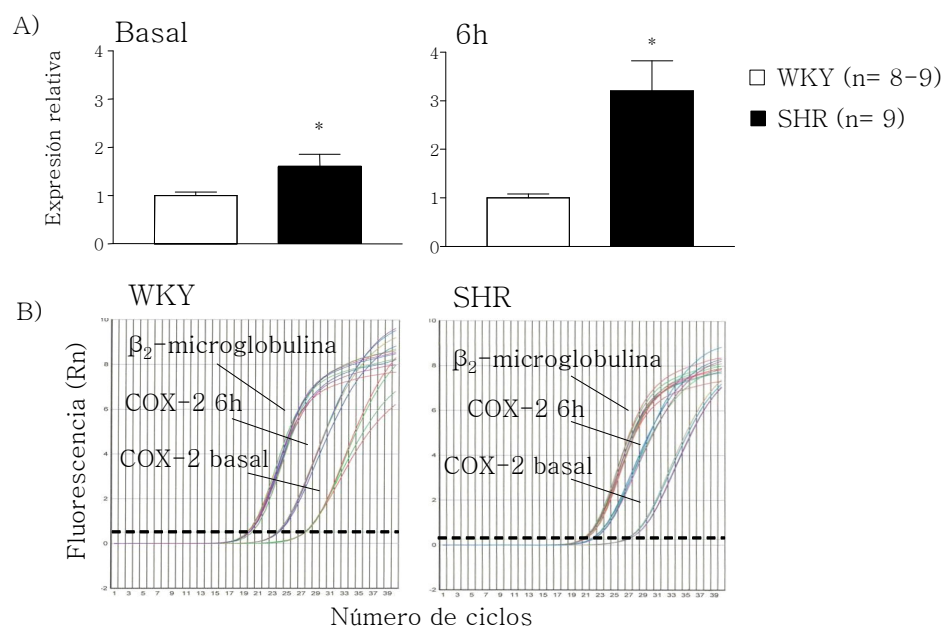


Fig. 36: A) Expresión de ARNm de COX-2 por PCR- RT cuantitativa en aorta de ratas WKY y SHR en condiciones basales y tras la incubación en el baño durante 6 horas (6h). Los resultados (media \pm ES) están expresados como la expresión relativa de ARNm en SHR comparada con WKY en cada una de las situaciones. B) Gráficas de amplificación del gen de COX-2. * $p < 0.05$ por ANOVA de una vía. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

4. 1. 2. Expresión de COX-2 por Western blot

Al igual que el ARNm, la expresión de la proteína de COX-2 en condiciones basales fue mayor en aorta de animales hipertensos que en animales normotensos. Tras realizar los experimentos de reactividad vascular (6h), la expresión de esta proteína se incrementó en ambas cepas, siendo significativamente mayor la expresión en la cepa hipertensa. La incubación de las arterias durante todo el experimento con dexametasona (1 μ M) disminuyó la expresión en los segmentos de aorta de SHR y de WKY. Por otro lado, la eliminación del endotelio no modificó la expresión de COX-2 en ninguna de las dos cepas (Fig. 37).

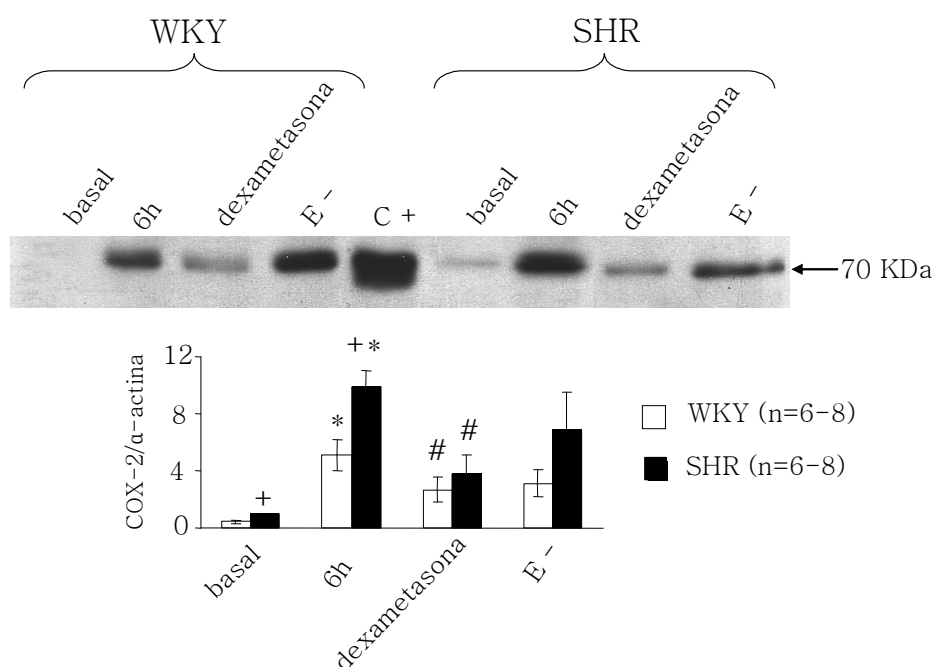


Fig. 37: Resultados del análisis de la expresión de COX-2 mediante la técnica de Western Blot en segmentos de aorta de ratas WKY y SHR en diferentes situaciones experimentales: basal (recién extraídos del animal), 6h (después de realizar los experimentos de reactividad en ausencia de fármaco, al cabo de 6 horas aproximadamente), después de la incubación con dexametasona (1 μ M) y sin endotelio (E-). La parte superior de la figura muestra un blot representativo. Como control positivo (C+) se utilizó homogenado de macrófagos de ratón estimulados con IL-1 β . Estos resultados (media \pm ES) se expresan como la relación entre la densidad de las bandas de COX-2 y de α -actina en cada caso y dando un valor de 1 a la relación de SHR basal en cada blot. *p < 0,01 vs basal. #p < 0,05 vs 6h. +p < 0,01 vs WKY por *t* de Student no pareada. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

4. 1. 3. Expresión de COX-2 por Inmunofluorescencia

En cortes transversales de tejidos frescos de aorta de WKY y de SHR no se observó expresión de COX-2 (Fig. 38A, B). Sin embargo, en cortes de segmentos de ambas cepas obtenidos al final de los experimentos de reactividad vascular, la expresión de COX-2 fue detectada tanto en células adventiciales como en células

endoteliales (Fig. 38C, D). La preincubación de los vasos con anticuerpos para la vimentina, que identifica fibroblastos, mostró colocalización con el anticuerpo de COX-2 en células de la capa adventicial de ambas cepas (Fig. 38E, F), lo que sugiere que los fibroblastos de la adventicia expresan COX-2. Por otro lado, algunas otras células de la adventicia mostraron marcaje para el anticuerpo de COX-2 pero no para el de vimentina, lo que indica que otras células de la adventicia, además de los fibroblastos, expresan COX-2.

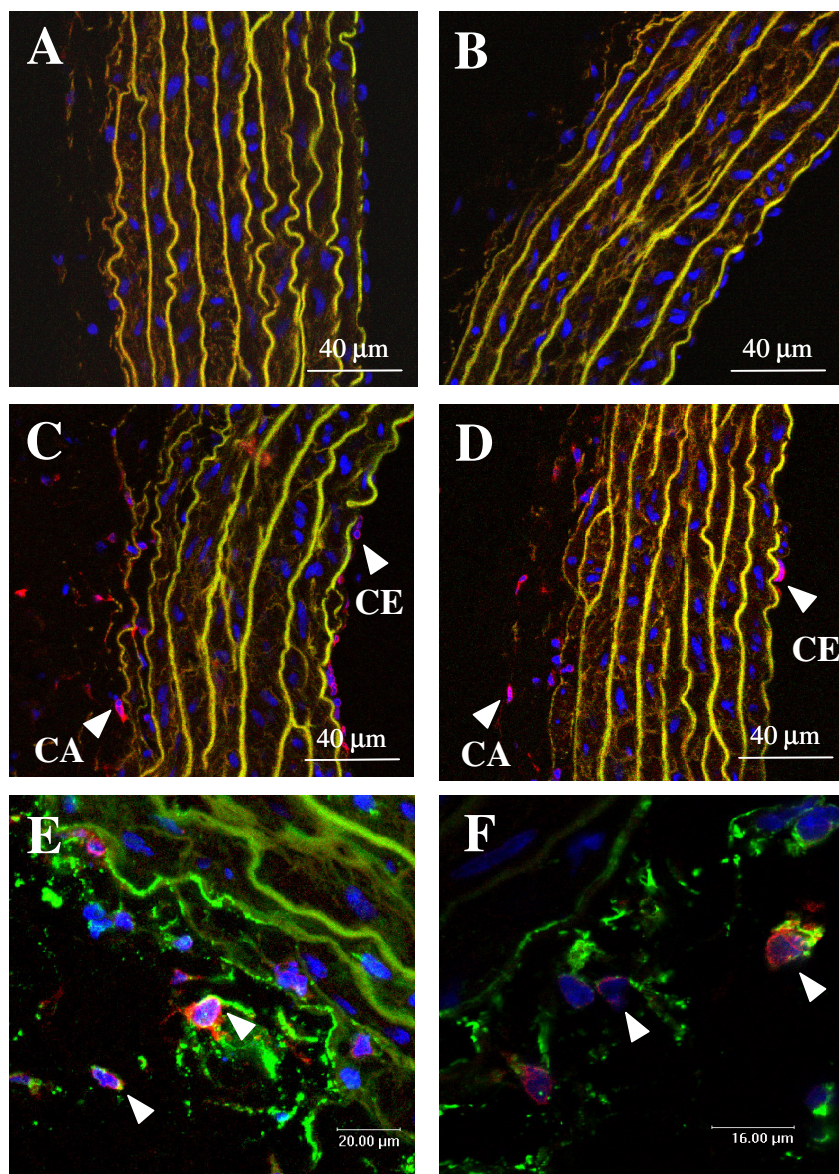


Fig. 38: Fotomicrografías representativas de la inmunofluorescencia de la isoforma inducible de la ciclooxigenasa (COX-2) en segmentos de aorta de ratas WKY (A, C, E) y SHR (B, D, F). A y B corresponden a cortes transversales de segmentos frescos de aorta de WKY y SHR; en C y D se muestran cortes transversales de segmentos de aorta de WKY y de SHR obtenidos tras la realización de la curva concentración-respuesta a fenilefrina. En E y F se muestran imágenes de la colocalización entre los anticuerpos de COX-2 y vimentina en segmentos de ambas cepas. CA, células adventiciales; CE, células endoteliales. (n=4).

4. 2. Papel de prostanoïdes sintetizados en el endotelio en la respuesta a fenilefrina

Con el objetivo de analizar si los prostanoïdes derivados de COX-2 que estan participando en la respuesta contráctil inducida por fenilefrina son sintetizados por la enzima que se expresaba en el endotelio, se estudió el efecto de NS 398 sobre las respuestas a fenilefrina en segmentos a los que se había eliminado la capa endotelial. Como podemos observar en la Fig. 39, NS 398 disminuyó la contracción inducida por fenilefrina en segmentos sin endotelio (E-) en ambas cepas, aunque esta inhibición fue mucho menor que la obtenida en segmentos con endotelio (E+), tanto en WKY (% dABC; E+: $36,9 \pm 3,0$; E-: $8,9 \pm 2,8$, $p < 0,0001$) como en SHR (% dABC; E+: $71,9 \pm 4,5$; E-: $12,7 \pm 2,2$, $p < 0,0001$).

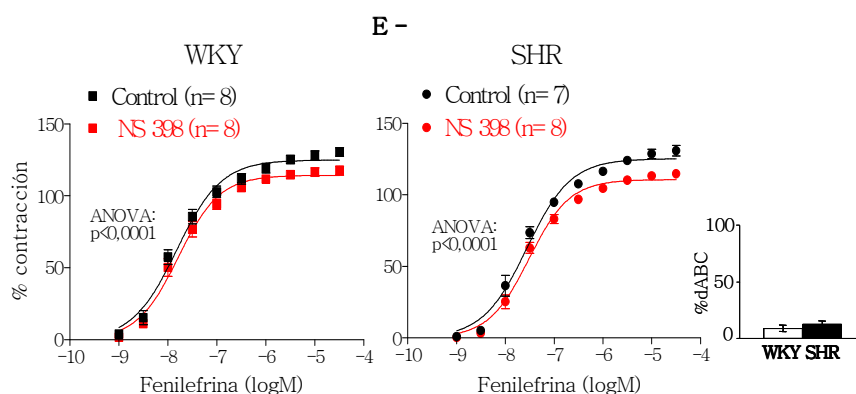


Fig. 39: Efecto de NS 398 (1 μ M) sobre la contracción inducida por fenilefrina en segmentos sin endotelio (E-) de aorta de ratas WKY y SHR. Los resultados (media \pm ES) estan expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ (75 mM). Los histogramas (media \pm ES) muestran las diferencias de área bajo las curvas a fenilefrina (dABC) en ausencia y presencia de NS 398, expresadas como porcentaje del ABC de arterias control. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

4. 3. Papel de prostanoïdes sintetizados en la adventicia en la respuesta a fenilefrina

Puesto que las imágenes obtenidas por inmunofluorescencia mostraban también una importante presencia de COX-2 en las células de la capa adventicial, quisimos comprobar si los prostanoïdes derivados de la COX-2 que se expresaba en la adventicia estaban participando en la respuesta a fenilefrina. Para ello, se estudió el efecto de NS 398 sobre las respuestas a fenilefrina en segmentos a los que se les eliminó este componente vascular. La eliminación de la adventicia incrementó la respuesta a fenilefrina en segmentos de ratas normotensas, pero no modificó la respuesta en ratas hipertensas (Fig. 40), lo que indica que la hipertensión altera la participación de un componente adventicial de naturaleza vasodilatadora. Por otra parte, como podemos observar en la Fig. 41, NS 398 disminuyó la contracción inducida por fenilefrina en segmentos sin adventicia en ambas cepas; esta inhibición fue superior en segmentos sin adventicia de animales hipertensos. Además, el efecto inhibitorio del NS 398 en segmentos sin adventicia (% dABC: WKY Adv- : $30,5 \pm 5,9$; SHR Adv- : $58,1 \pm 8$) fue similar al efecto inhibitorio del NS 398 en segmentos con adventicia (% dABC: WKY Adv+ : $36,9 \pm 3,0$; SHR Adv+ : $71,9 \pm 4,5$), $p > 0,05$ en ambas cepas, demostrando de esta forma que los prostanoïdes derivados de la COX-2 expresada en la adventicia no estarían participando en la respuesta contráctil a fenilefrina.

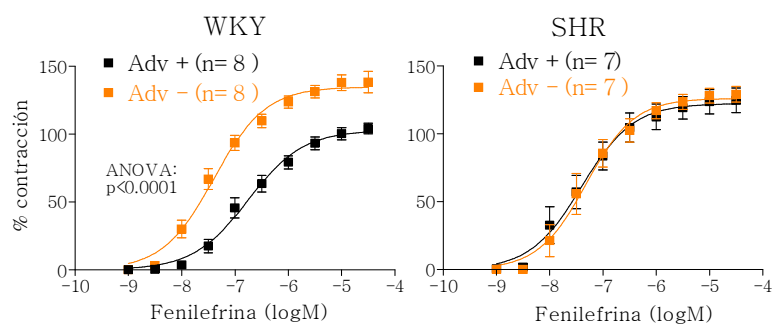


Fig. 39: Curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos con (Adv +) y sin adventicia (Adv -) de ratas WKY y SHR. Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ (75 mM). Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

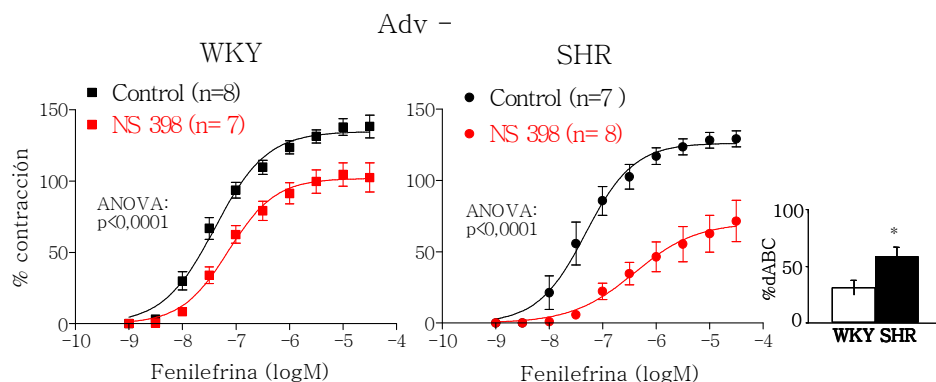


Fig. 40: Efecto de NS 398 (1 μ M) sobre la contracción inducida por fenilefrina en segmentos sin adventicia (Adv -) de aorta de ratas WKY y SHR. Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ (75 mM). Los histogramas (media \pm ES) muestran las diferencias de área bajo las curvas a fenilefrina (dABC) en ausencia y presencia de NS 398, expresadas como porcentaje del ABC de arterias control. * $p < 0,05$ vs WKY por t de Student no pareada. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

4. 4. Cuantificación de la liberación de eicosanoides en el medio de incubación de segmentos de ratas normotensas e hipertensas.

Como hemos mencionado anteriormente, los prostanoïdes contráctiles que participaban en la respuesta a fenilefrina actuaban a través del receptor TP y no era TXA₂. Por ello, procedimos a determinar la liberación de varios prostanoïdes distintos al TXA₂ que también producen respuestas contráctiles por unión a este receptor.

La PGF_{2α} es uno de los prostanoïdes que puede inducir vasoconstricción mediada por el receptor TP. Este prostanoïde es rápidamente metabolizado a 13,14-dihidro-15-ceto PGF_{2α}. De igual forma, los isoprostanos son una familia de eicosanoides que pueden producir vasoconstricción a través del receptor TP. El metabolito de la PGF_{2α}, 13,14-dihidro-15-ceto PGF_{2α} y 8-isoprostanos se determinaron en el medio Krebs Henseleit, una vez finalizada la curva concentración respuesta a fenilefrina.

Los niveles de 13,14-dihidro-15-ceto PGF_{2α} y de 8-isoprostanos fueron mayores en el medio de incubación de los segmentos de animales hipertensos que normotensos (Fig. 41). El inhibidor selectivo de COX-2, NS 398 (1 μM) disminuyó la liberación de 13,14-dihidro-15-ceto PGF_{2α} y de 8-isoprostanos, solamente en segmentos de aorta de ratas SHR.

La prostaciclina es el principal prostanoïde vasodilatador producido por el endotelio. Los efectos inhibitorios de los fármacos que interfieren con la vía de la COX, pueden deberse además de al incremento de prostanoïdes vasoconstrictores, a una reducción de

los prostanoides vasodilatadores. Por otro lado, también se ha demostrado que altas concentraciones de prostaciclina pueden inducir vasoconstricción a través de la unión con el receptor TP (Rapoport y Williams, 1996, Blanco-Rivero y cols., 2005). Por todo esto, se determinó la producción del metabolito de la prostaciclina, 6-ceto-PGF_{1α}, en el KH una vez finalizada la curva concentración respuesta a fenilefrina. Al igual que con el 13,14-dihidro-15-ceto PGF_{2α} y 8-isoprostanos, los niveles de PGF_{1α} fueron mayores en segmentos de ratas hipertensas, y disminuyeron después de tratar los segmentos con el inhibidor selectivo de la COX-2, NS 398, sólo en el medio de animales hipertensos (Fig. 41).

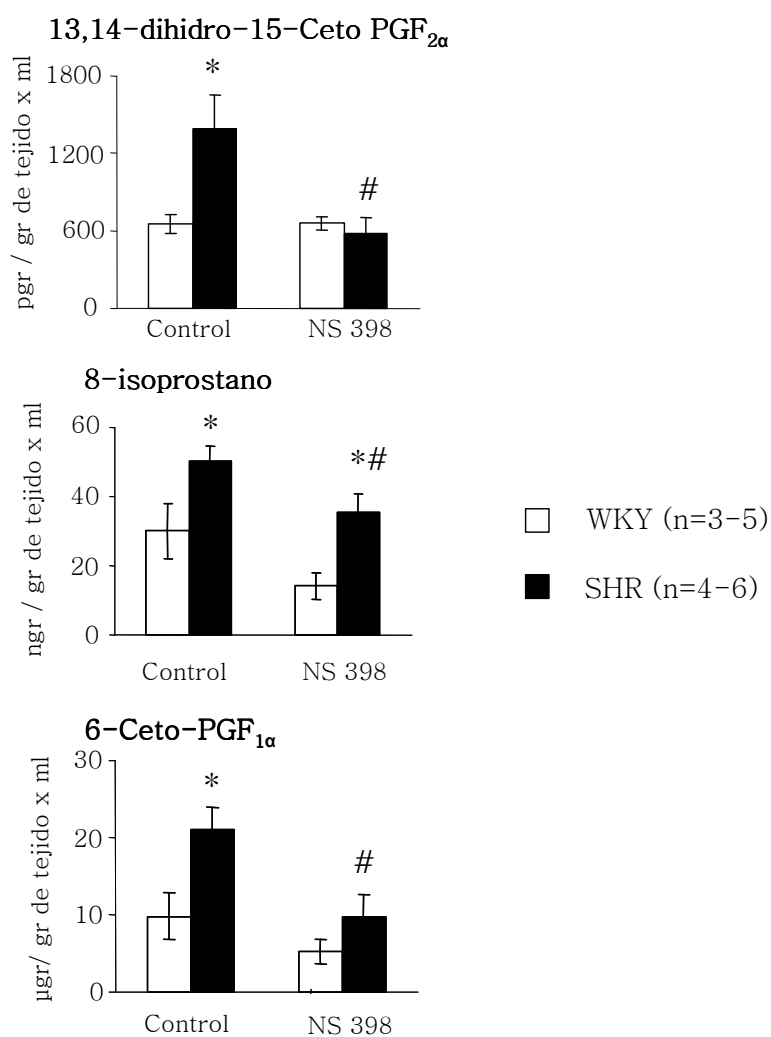


Fig. 41: Efecto de NS 398 (1 μ M) sobre la liberación de 13,14-dihidro-15-ceto PGF_{2α}, 8 isoprostanos y 6-ceto PGF_{1α} en segmentos de aorta de ratas WKY y SHR. Los resultados son media \pm ES. * $p < 0,05$ vs WKY. # $p < 0,05$ vs Control por t de Student no pareada. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

5. Papel del sistema renina-angiotensina en la producción vascular de derivados de COX-2

Existen numerosas evidencias que indican que la angiotensina II (AngII) modula la síntesis de factores de transcripción, moléculas de adhesión, citoquinas y quimiocinas, lo que va a ocasionar acciones proinflamatorias que pueden ser importantes en la patogénesis de la hipertensión. En base a ello y con el fin de analizar si la AngII está modulando la aumentada participación de prostanoides contráctiles derivados de COX-2 en la respuesta a fenilefrina observada con la hipertensión, se llevó a cabo un tratamiento de las ratas con el antagonista del receptor AT₁ de la AngII, losartán (15 mgr/Kgr/día) durante 12 semanas.

5.1. Efecto del losartán sobre la presión arterial

El tratamiento con losartán disminuyó la presión arterial sistólica de las ratas hipertensas desde la tercera semana de tratamiento. Al final del tratamiento no se encontraron diferencias en la presión arterial entre las dos cepas (Fig. 42).

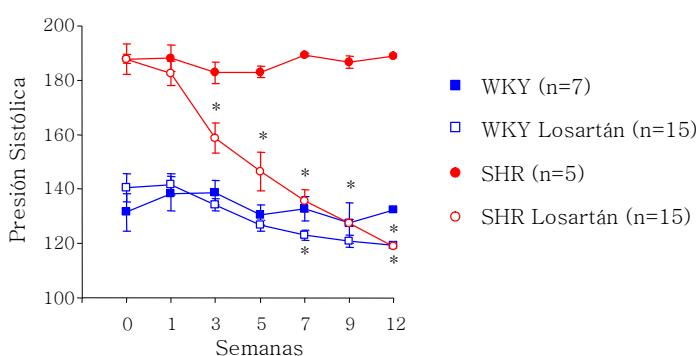


Fig 42: Presión arterial sistólica en ratas normotensas e hipertensas sin tratamiento y tratadas durante 12 semanas con losartán (15 mg/Kg/día). Los resultados (media \pm ES) están expresados en mm Hg. * $p < 0,01$ vs no tratado por t de Student no pareada. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

5.2. Efecto del losartán sobre las respuestas vasculares a fenilefrina y acetilcolina

El tratamiento con losartán no modificó la respuesta contráctil a fenilefrina en ninguna de las dos cepas (Fig. 43); sin embargo, mejoró la respuesta vasodilatadora a acetilcolina en segmentos de ambas cepas (Fig 44).

La respuesta contráctil inducida por K^+ en ratas tratadas con losartán fue de $2850,7 \pm 107,2$ mg (n=16) y de $2282,7 \pm 83,6$ mg (n=20) ($p < 0,0001$) en ratas WKY y SHR, respectivamente.

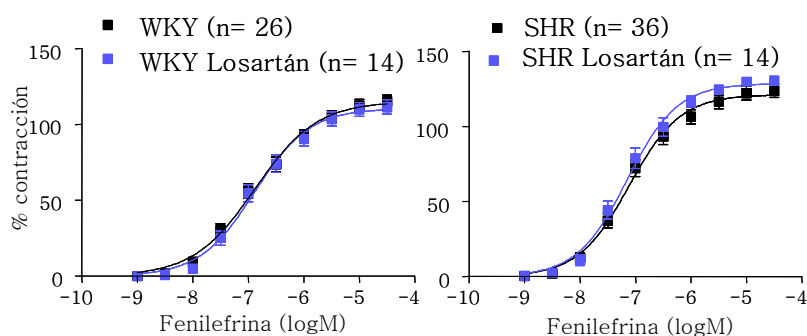


Fig. 43: Curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de aorta de animales WKY y SHR sin tratar y tratados con losartán (15 mg/Kg/día). Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ (75 mM). Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

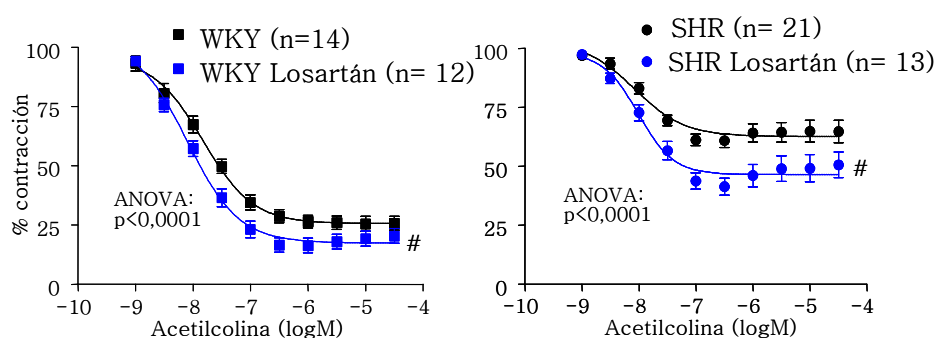


Fig. 44: Curva concentración-respuesta a acetilcolina en segmentos de aorta de animales WKY y SHR sin tratar y tratados con losartán (15 mg/Kg/día). Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por fenilefrina. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

5.3. Efecto del losartán sobre la participación de prostanoides contráctiles derivados de COX-2 en la respuesta a fenilefrina

El tratamiento con losartán disminuyó los efectos producidos por el inhibidor selectivo de COX-2 NS 398 (1 μ M) (Fig. 45), el inhibidor de la síntesis de proteínas, dexametasona (1 μ M) (Fig. 46), y el antagonista del receptor del TXA₂/PGH₂, SQ 29,548 (1 μ M) (Fig. 47), en las respuestas contráctiles a fenilefrina en segmentos de animales hipertensos, pero no modificó el efecto de estos fármacos en animales normotensos. Estos resultados sugieren que el sistema renina-angiotensina estaría implicado en la mayor participación de prostanoides contráctiles derivados de COX-2 observada con la hipertensión.

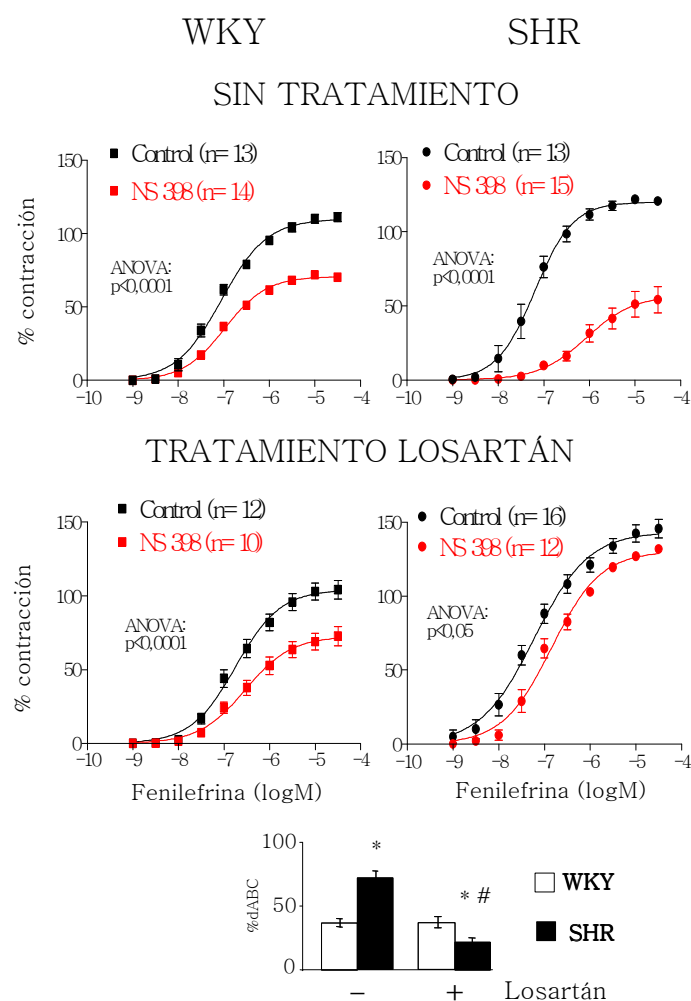


Fig. 45: Efecto de NS 398 (1 μ M) sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de aorta de WKY y SHR tratadas con losartán (15 mg/Kg/día). A efectos comparativos se muestran también los resultados obtenidos en las ratas sin tratar. Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ (75 mM). Los histogramas (media \pm ES) muestran las diferencias de área bajo las curvas a fenilefrina (dABC) en segmentos de aorta de ratas sin (-) y con (+) tratamiento con losartán en ausencia y presencia de NS 398, expresadas como porcentaje del ABC de arterias control. * $p < 0,05$ vs WKY. # $p < 0,05$ vs no tratadas por t de Student no pareada. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

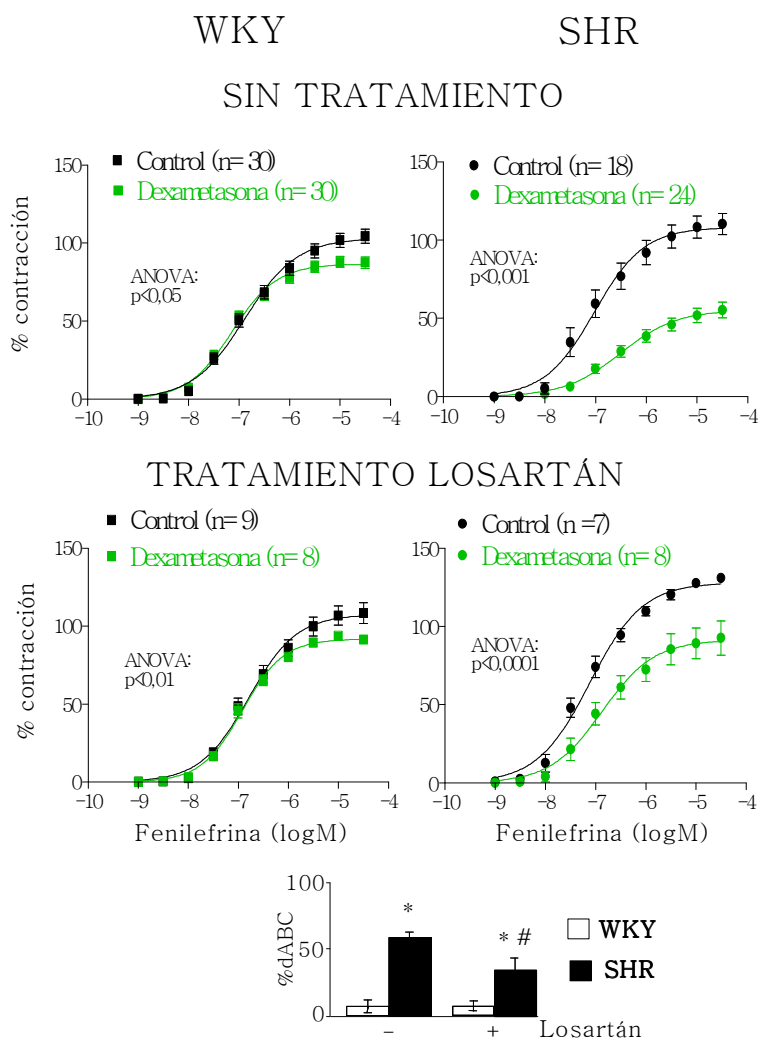


Fig. 46: Efecto de dexametasona (1 μ M) sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de aorta de WKY y SHR tratadas con losartán (15 mg/Kg/día). A efectos comparativos se muestran también los resultados obtenidos en las ratas sin tratar. Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ (75 mM). Los histogramas (media \pm ES) muestran las diferencias de área bajo las curvas a fenilefrina (dABC) en segmentos de aorta de ratas sin (-) y con (+) tratamiento con losartán en presencia y ausencia de dexametasona, expresadas como porcentaje del ABC de arterias control. * $p < 0,05$ vs WKY. # $p < 0,05$ vs no tratadas por t de Student no pareada. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

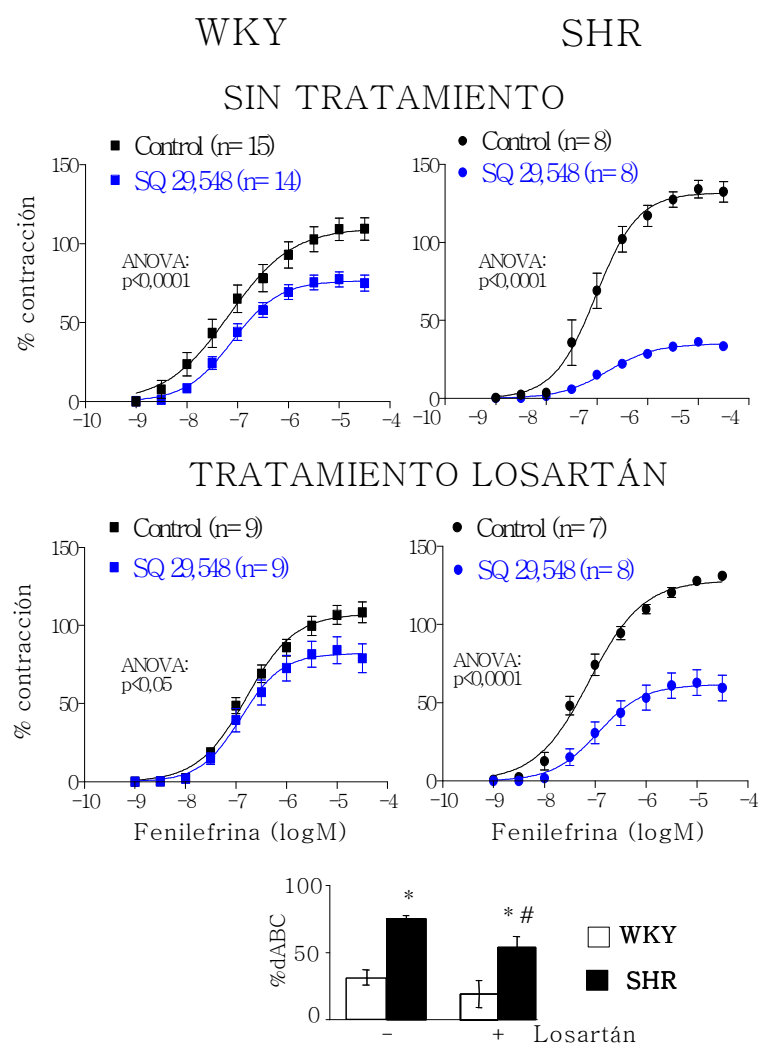


Fig. 47: Efecto de SQ 29,548 (1 μ M) sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de aorta de WKY y SHR tratadas con losartán (15 mg/Kg/día). A efectos comparativos se muestran también los resultados obtenidos en las ratas sin tratar. Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ (75 mM). Los histogramas (media \pm ES) muestran las diferencias de área bajo las curvas a fenilefrina (dABC) en segmentos de aorta de ratas sin (-) y con (+) tratamiento con losartán en ausencia y presencia de SQ 29,548, expresadas como porcentaje del ABC de arterias control. * $p < 0,05$ vs WKY. # $p < 0,05$ vs no tratadas por t de Student no pareada. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

5.4. Efecto del losartán sobre la expresión vascular de COX-2

Para analizar si la disminución en la participación de prostanoïdes contráctiles derivados de COX-2 en segmentos de ratas hipertensas tratadas con losartán se debía a la disminución en la expresión de esta enzima, se analizó el efecto del tratamiento sobre la expresión del ARNm y de la proteína de COX-2 en segmentos recién extraídos del animal (condiciones basales) y en segmentos obtenidos al finalizar la curva concentración-respuesta a fenilefrina (6h).

5.4.1. Expresión de COX-2 por PCR-RT cuantitativa

El tratamiento de los animales hipertensos con losartán disminuyó la expresión aórtica de ARNm, tanto en segmentos en condiciones basales como en segmentos preincubados en las mismas condiciones que los segmentos utilizados en reactividad vascular. Sin embargo, el tratamiento no modificó la expresión de ARNm en la cepa normotensa en ninguna de las dos situaciones experimentales (Fig. 48).

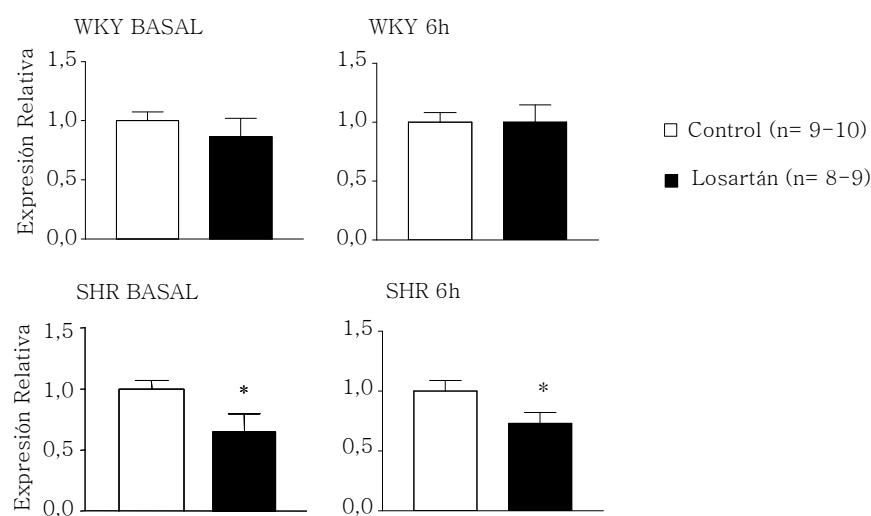


Fig. 48: Análisis de la expresión por PCR-RT cuantitativa del ARNm de COX-2 en aorta de WKY y SHR sin tratar o tratadas con losartán (15 mg/Kg/día) en arterias recién extraídas (condiciones basales) y en arterias incubadas durante 6 horas en las mismas condiciones que los segmentos de reactividad vascular (6h). Los resultados (media \pm ES) están expresados como la expresión relativa del ARNm en segmentos de animales tratados con losartán comparados con segmentos sin tratar en cada una de las situaciones. * $p < 0,05$ por ANOVA de una vía. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

5.4.2. Expresión de COX-2 por Western blot

Al igual que ocurrió con la expresión del ARNm, el tratamiento con losartán disminuyó la expresión de la proteína de COX-2 en segmentos de ratas SHR en condiciones basales, mientras que no modificó la expresión observada en animales normotensos en esas mismas condiciones. El tratamiento con losartán redujo la incrementada expresión de COX-2 observada en animales hipertensos tras la realización de la curva concentración-respuesta a fenilefrina, aproximadamente a las 6 horas de la extracción de la arteria, pero no en animales normotensos, de tal

manera que en estas condiciones la expresión de COX-2 fue similar en segmentos de ratas WKY y SHR tratadas con losartán (Fig. 49).

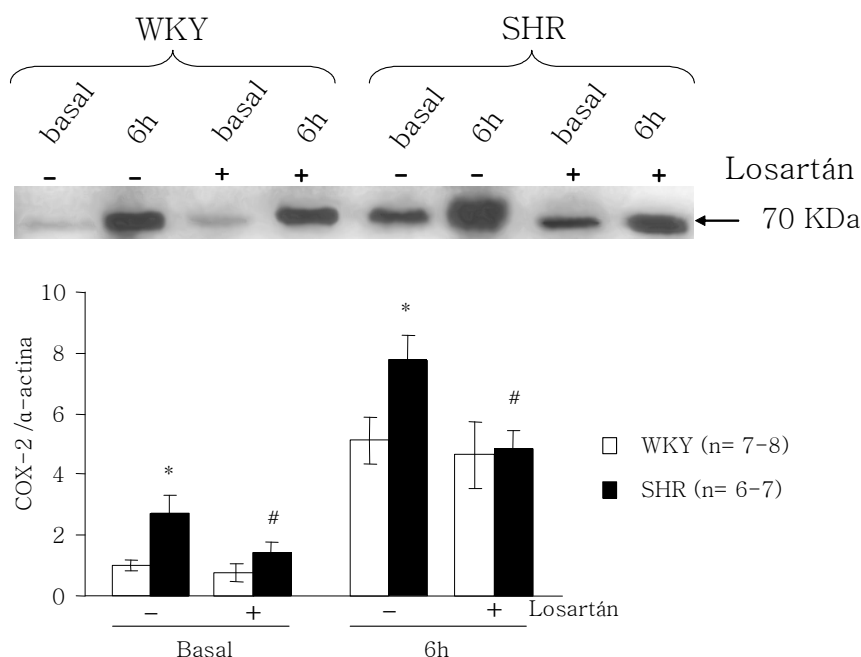


Fig. 49: Resultados del análisis de la expresión de COX-2 mediante la técnica de Western Blot en segmentos de aorta de ratas WKY y SHR tratadas con losartán (15 mg/Kg/día), recién extraídas del animal (basal) y después de realizar los experimentos de reactividad, al cabo de 6 horas, aproximadamente (6h). A efectos comparativos, se muestran también los resultados obtenidos en ratas sin tratar. La parte superior de la figura muestra un blot representativo. Como control positivo se utilizó homogenado de macrófagos de ratón estimulados con IL-1 β . Los resultados (media \pm ES) se expresan como la relación entre la densidad de las bandas de COX-2 y α -actina, en cada caso con respecto a la densidad de las bandas de COX-2 en situación basal de segmentos de WKY sin tratar. * $p < 0,01$ vs WKY, # $p = 0,05$ vs Losartán. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

Estos resultados indican que el incremento en la expresión de COX-2 con la hipertensión se debe, al menos en parte, a la activación de los receptores AT₁ y demuestran el importante papel que juega el sistema renina-angiotensina en este proceso patológico.

5.5. Efecto del losartán sobre la liberación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y 8-isoprostano

Puesto que el tratamiento con losartán disminuyó la participación de prostanoïdes contráctiles derivados de COX-2 en la respuesta a fenilefrina y la expresión tanto del ARNm como de la proteína de COX-2, quisimos analizar si dicho tratamiento modificaba también la producción de prostanoïdes vasoconstrictores en el medio de incubación donde se realiza la curva concentración-respuesta a fenilefrina. La Fig. 50 muestra como el tratamiento disminuyó la liberación del metabolito de la $\text{PGF}_{2\alpha}$, 13-14 dihidro 15-ceto $\text{PGF}_{2\alpha}$ en el medio de incubación de los segmentos aórticos de ratas hipertensas pero no en el de segmentos de animales normotensos. Además, en segmentos de ratas SHR tratadas con losartán el inhibidor selectivo de COX-2, NS 398 (1 μM), no modificó la liberación de 13-14 dihidro 15-ceto $\text{PGF}_{2\alpha}$ al medio de incubación, como ocurría en el caso de segmentos de ratas SHR sin tratar. De manera similar, el tratamiento con losartán disminuyó únicamente la liberación de 8-isoprostanos al medio de incubación de segmentos de animales hipertensos y abolió el efecto inhibitorio del NS 398 sobre la producción de 8-isoprostanos (Fig. 50).

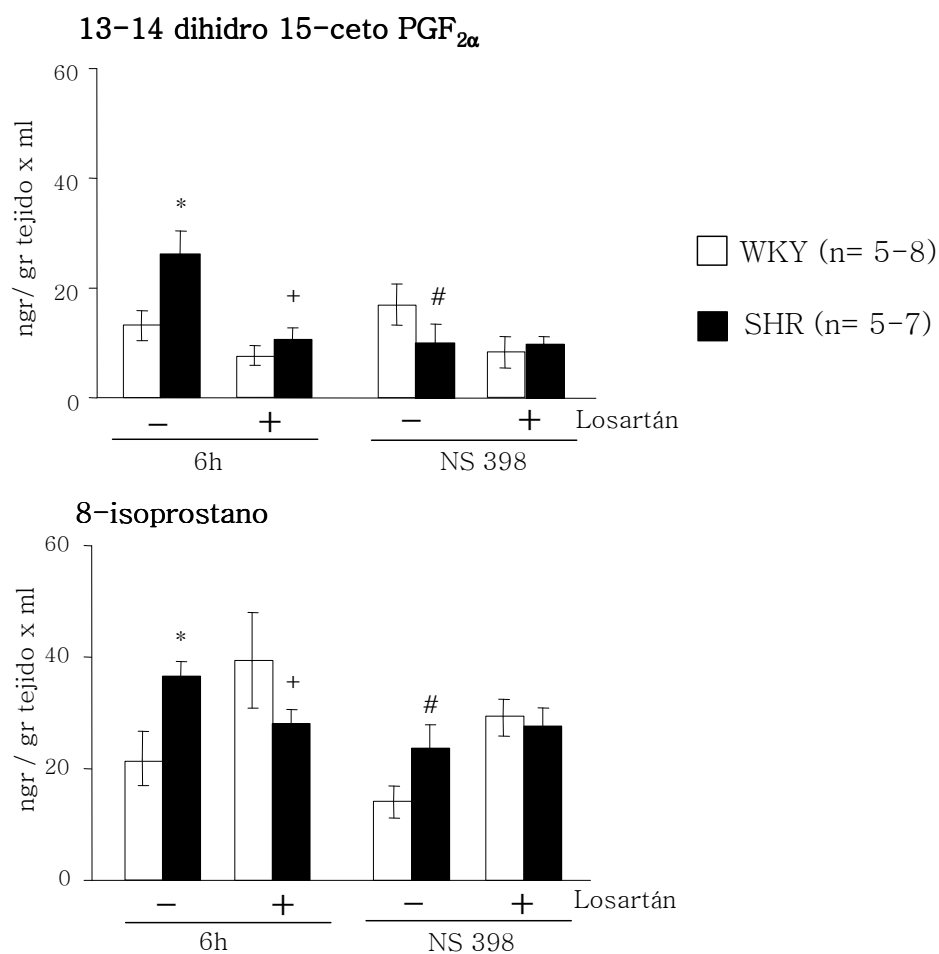


Fig. 50: Efecto del tratamiento con losartán (15 mg/Kg/día) sobre la liberación de 13,14-dihidro-15-ceto PGF_{2α} y de 8-isoprostanos en segmentos de aorta de ratas WKY y SHR sin tratar o tratadas con NS 398 (1 μM). A efectos comparativos se muestran también los resultados obtenidos en las ratas sin tratar. Los resultados se expresan como media ± ES. *p < 0,05 vs WKY. #p < 0,05 vs 6h. + p < 0,01 vs no tratadas por *t* de Student no pareada. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

5.6. Efecto del losartán sobre la producción de $O_2^{\cdot-}$, la producción de malondialdehído y el estado antioxidante total

Es conocido que la AngII puede participar en el incremento del estrés oxidativo asociado a la hipertensión. Por ello, analizamos la producción de $O_2^{\cdot-}$ en segmentos de aorta y la producción de MDA y el TAS en el plasma de ratas normotensas e hipertensas tratadas con losartán. Al igual que la producción vascular de $O_2^{\cdot-}$, los niveles de MDA medidos en plasma fueron mayores en las ratas hipertensas (Fig 51 A, B); sin embargo el TAS, fue similar en ambas cepas. El tratamiento con losartán disminuyó la producción de $O_2^{\cdot-}$ solamente en segmentos de ratas hipertensas (Fig. 51B), disminuyó la producción de MDA en ambas cepas (Fig. 39B) e incrementó el TAS solamente en el plasma procedente de ratas hipertensas (Fig. 51C).

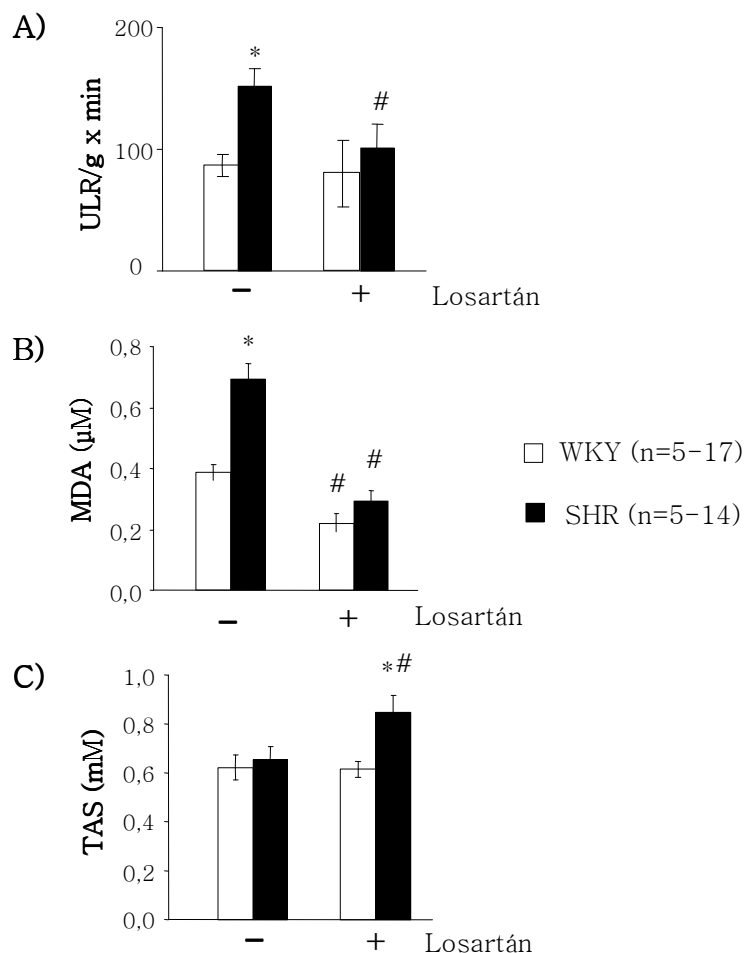


Fig. 51: Efecto del tratamiento con losartán (15 mg/kg/día) sobre A) la producción de anión superóxido en segmentos de aorta, B) los niveles plasmáticos de malondialdehído (MDA) y C) el estado antioxidante total (TAS) plasmático de ratas WKY y SHR. * $p < 0,05$ vs WKY. # $p < 0,05$ vs no tratadas por t de Student no pareada. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

Los resultados presentados en este apartado indican que la AngII, a través de su receptor AT_1 estaría modulando la mayor participación de prostanoïdes contráctiles derivados de COX-2 y su producción a través de la regulación de la expresión de COX-2. Asimismo, la activación de dichos receptores participa en el incremento del estrés oxidativo observado con la hipertensión.

6. Papel de los aniones superóxido en la producción vascular de derivados de COX-2

Se ha descrito ampliamente que el $O_2^{\cdot-}$ juega un papel importante en la respuesta inflamatoria inducida por angiotensina II (Touyz, 2004; Dhalla y cols., 2004). En este trabajo hemos visto que el tratamiento con losartán disminuye la producción de $O_2^{\cdot-}$ en aorta de ratas hipertensas, abole el incremento de los niveles de MDA plasmático observado en ratas hipertensas e incrementa el estado antioxidante total en estas ratas. Por otra parte, trabajos previos de nuestro laboratorio habían demostrado que el estrés oxidativo incrementa la expresión de COX-2 en la aorta de rata (García-Cohen y cols., 2000). Con el fin de estudiar si el incremento del estrés oxidativo descrito en la hipertensión está implicado en la mayor participación de prostanoïdes contráctiles derivados de COX-2 en la respuesta a fenilefrina, se trataron ratas WKY y SHR con el análogo de la superóxido dismutasa, tempol (1 mM) durante 17 días.

6.1. Efecto del tempol sobre la presión arterial

El tratamiento con tempol disminuyó la presión arterial en ratas hipertensas (Fig. 52), lo que indica que el anión superóxido juega un papel importante en la elevación de la presión arterial. El tratamiento con tempol disminuyó asimismo la presión arterial en ratas normotensas (Fig. 52).

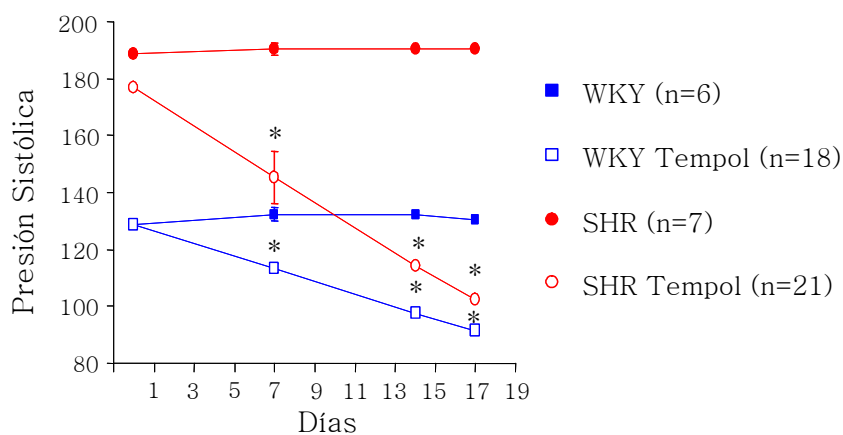


Fig 52: Presión arterial sistólica en ratas normotensas e hipertensas sin tratamiento y tratadas durante 17 días con tempol (1 mM). Los resultados (media \pm ES) están expresados en mm Hg. * $p < 0,0001$ vs no tratadas por t de Student no pareada. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

6.2. Efecto del tempol sobre las respuestas vasculares a fenilefrina y acetilcolina

El tratamiento de las ratas con tempol, no modificó la respuesta contráctil a fenilefrina (Fig 53) y, tampoco alteró las relajaciones a acetilcolina en ninguna de las dos cepas (Fig. 54).

La respuesta contráctil inducida por K^+ en ratas tratadas con tempol fue de $3241,7 \pm 82,7$ mg (n=9) y de $2442,1 \pm 93,9$ mg (n=11) ($p < 0,0001$) en ratas WKY y SHR respectivamente.

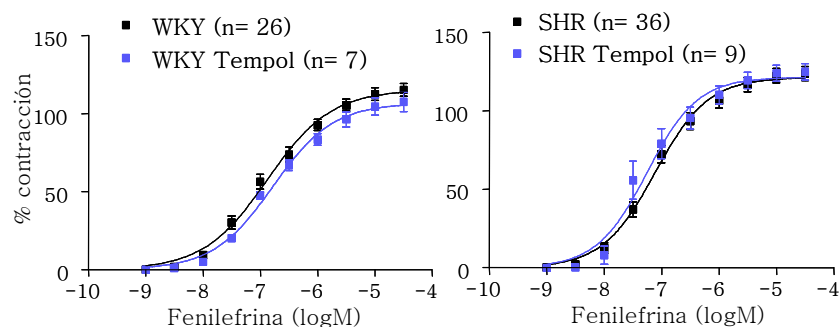


Fig. 53: Curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de aorta de animales WKY y SHR sin tratar y tratados con tempol (1 mM). Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ (75 mM). Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

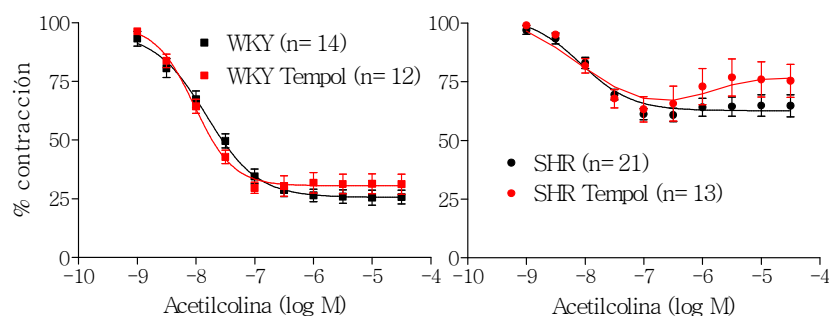


Fig. 54: Curva concentración-respuesta a acetilcolina en segmentos de aorta de animales WKY y SHR sin tratamiento y tratados durante 17 días con tempol (1 mM). Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por fenilefrina. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

6.3. Efecto del tempol sobre la participación de prostanoideos contráctiles derivados de COX-2 en la respuesta a fenilefrina

El tratamiento con tempol disminuyó el efecto inhibitorio producido por NS 398 (1 μ M), dexametasona (1 μ M) y SQ 29,548 (1 μ M) sobre las curvas concentración respuesta a fenilefrina en segmentos de ratas hipertensas, pero no de normotensas (Figs. 55, 56 y 57).

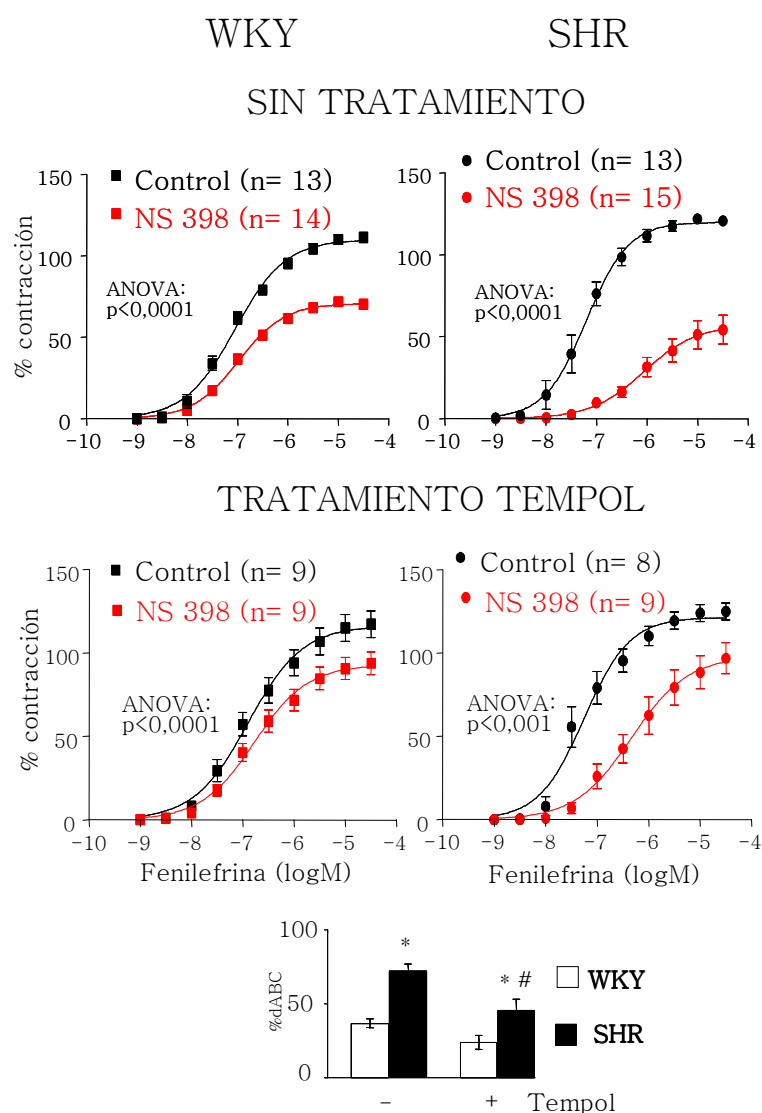


Fig. 55: Efecto de NS 398 (1 μ M) sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de aorta de WKY y SHR tratadas con tempol (1 mM). A efectos comparativos se muestran también los resultados obtenidos en las ratas sin tratar. Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ (75 mM). Los histogramas (media \pm ES) muestran las diferencias de área bajo las curvas a fenilefrina (dABC) en segmentos de aorta de ratas sin (-) y con (+) tratamiento con tempol en ausencia y presencia de NS 398, expresadas como porcentaje del ABC de arterias control.* p< 0,05 vs WKY. # p< 0,05 vs no tratadas por *t* de Student no pareada. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

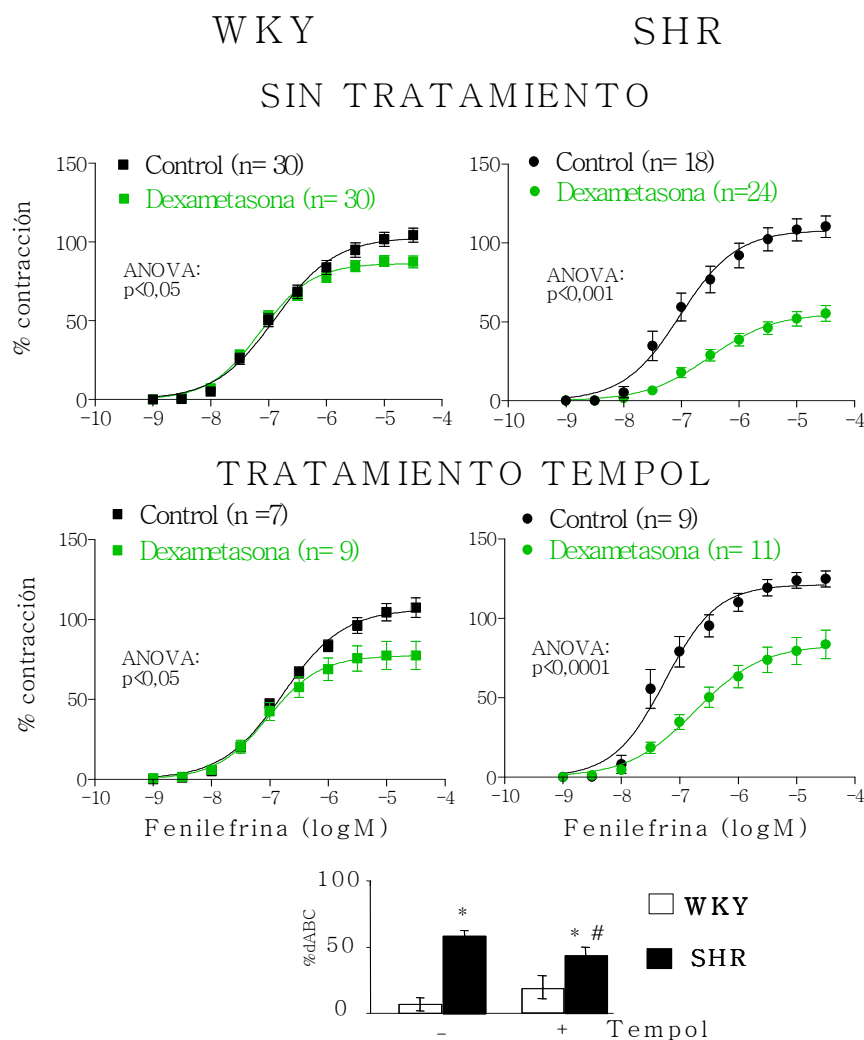


Fig. 56: Efecto de dexametasona (1 μ M) sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de aorta de WKY y SHR tratadas con tempol (1 mM). A efectos comparativos se muestran también los resultados obtenidos en las ratas sin tratar. Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ (75 mM). Los histogramas (media \pm ES) muestran las diferencias de área bajo las curvas a fenilefrina (dABC) en segmentos de aorta de ratas sin (-) y con (+) tratamiento con tempol en presencia y ausencia de dexametasona, expresadas como porcentaje del ABC de arterias control. * $p < 0,05$ vs WKY. # $p < 0,05$ vs no tratadas por t de Student no pareada. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

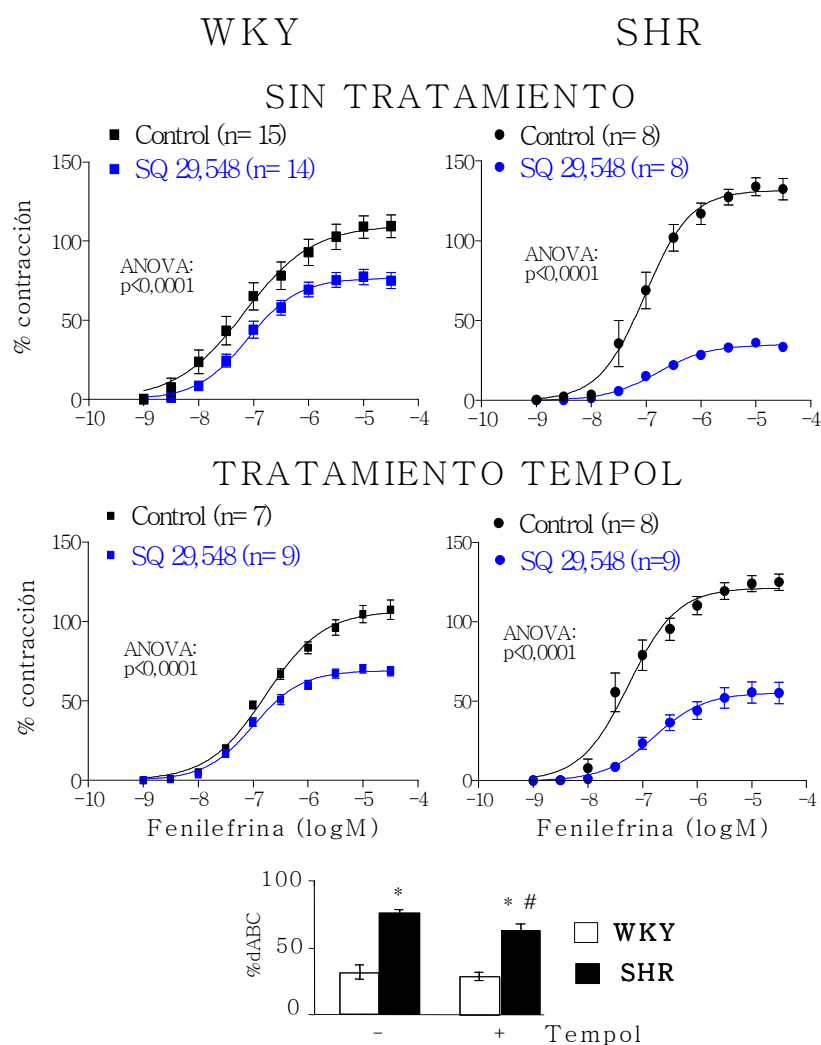


Fig. 57: Efecto de SQ 29,548 (1 μ M) sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de aorta de WKY y SHR tratadas con tempol (1 mM). A efectos comparativos se muestran también los resultados obtenidos en las ratas sin tratar. Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ (75 mM). Los histogramas (media \pm ES) muestran las diferencias de área bajo las curvas a fenilefrina (dABC) en segmentos de aorta de ratas sin (-) y con (+) tratamiento con tempol en ausencia y presencia de SQ 29,548, expresadas como porcentaje del ABC de arterias control. * $p < 0,05$ vs WKY. # $p < 0,05$ vs no tratadas por t de Student no pareada. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

6.4. Efecto del tempol sobre la expresión vascular de COX-2

Los datos obtenidos en segmentos aórticos de ratas tratadas con tempol y presentados hasta ahora, sugerían que el anión superóxido estaba implicado en la mayor participación de prostanoïdes contráctiles derivados de COX-2 en aorta de ratas hipertensas. Para determinar si la disminución en los efectos inhibitorios de NS 398, dexametasona y SQ 29,548 se debía a la alteración en la expresión de COX-2, analizamos la expresión del ARNm y de la proteína de dicho enzima.

6.4.2. Expresión de COX-2 por PCR-RT cuantitativa

El tratamiento con tempol no modificó la expresión de ARNm de COX-2 en segmentos recién extraídos del animal en ninguna de las dos cepas. La expresión del ARNm de COX-2 de segmentos preincubados durante 6 horas en las mismas condiciones que se realizaron los experimentos de reactividad vascular, tampoco fue modificada por el tratamiento con tempol ni en WKY ni en SHR (Fig. 58).

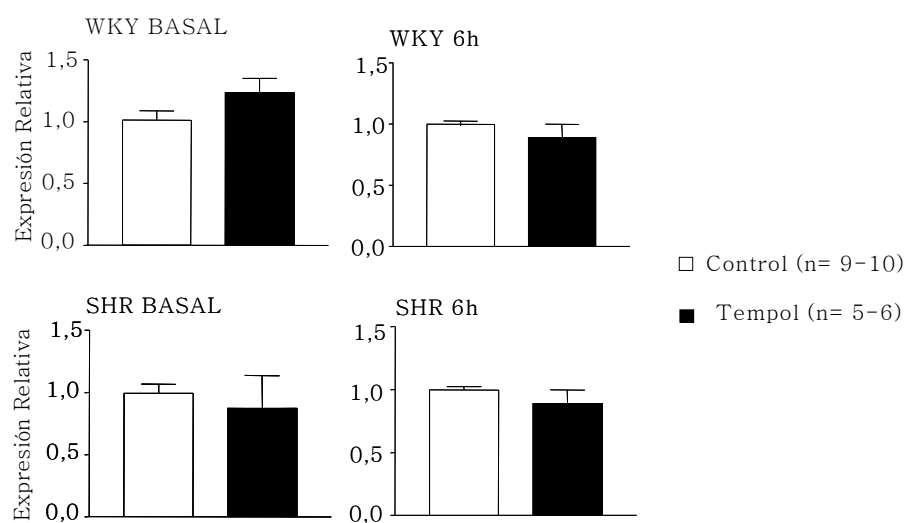


Fig. 58: Análisis de la expresión por PCR-RT cuantitativa del ARNm de COX-2 en aorta de WKY y SHR sin tratar o tratadas con tempol (1 mM) en arterias recién extraídas (condiciones basales) y en arterias incubadas durante 6 horas en las mismas condiciones que los experimentos de reactividad vascular (6h). Los resultados (media \pm ES) están expresados como la expresión relativa del ARNm en segmentos de animales tratados con tempol comparados con segmentos sin tratar en cada una de las situaciones. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

6.4.1. Expresión de COX-2 por Western blot

Se analizó la expresión de la proteína COX-2 en segmentos recién extraídos del animal (condiciones basales) y en segmentos obtenidos al finalizar la curva concentración-respuesta a fenilefrina (6h). Ambas condiciones se compararon con los resultados obtenidos en animales no tratados con tempol.

Al igual que los resultados obtenidos en la cuantificación de la expresión del ARNm de COX-2, el tratamiento con tempol tampoco modificó la expresión de la proteína de COX-2 en segmentos de ratas WKY y SHR en condiciones basales. Igualmente, tras la realización de la curva concentración-respuesta a fenilefrina, aproximadamente a las 6 horas de la extracción de la arteria, la

expresión de COX-2 siguió siendo mayor en segmentos de ratas SHR tratadas con tempol (Fig. 59).

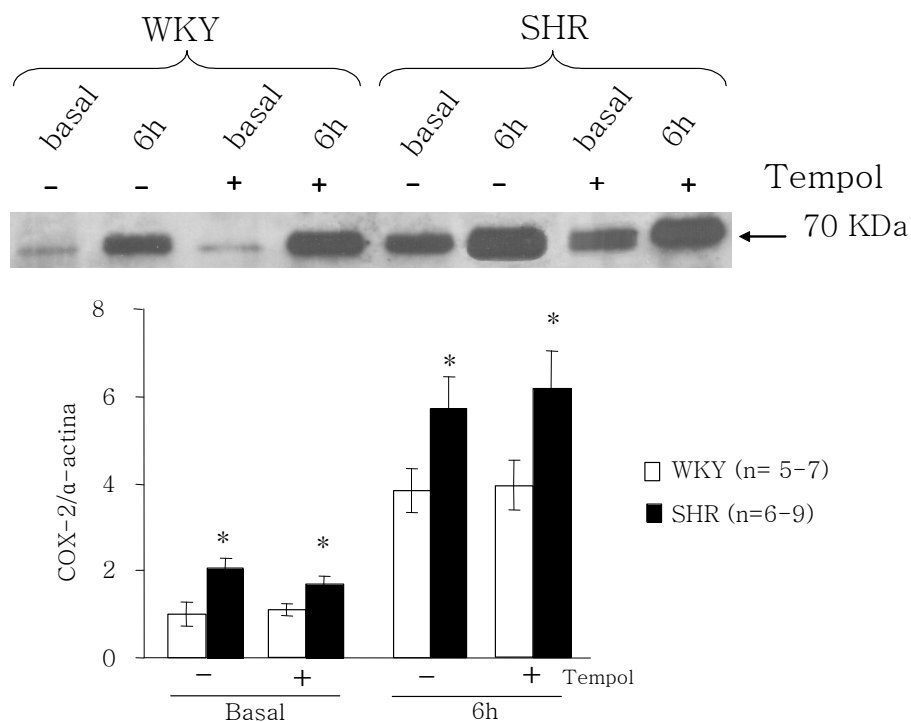


Fig. 59: Resultados del análisis de la expresión de COX-2 mediante la técnica de Western Blot en segmentos de aorta de ratas WKY y SHR tratadas con tempol (1 mM), recién extraídas del animal (basal) y después de realizar los experimentos de reactividad, al cabo de 6 horas, aproximadamente (6h). A efectos comparativos, se muestran también los resultados obtenidos en ratas sin tratar. La parte superior de la figura muestra un blot representativo. Como control positivo se utilizó homogenado de macrófagos de ratón estimulados con IL-1 β . Los resultados (media \pm ES) se expresan como la relación entre la densidad de las bandas de COX-2 y α -actina en cada caso con respecto a la densidad de las bandas de COX-2 y α -actina en situación basal de segmentos de WKY sin tratar. * $p < 0.05$ vs WKY por t de Student. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

6.5. Efecto del tempol sobre la liberación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y 8-isoprostano

Puesto que la disminución de los efectos del NS 398, dexametasona y SQ 29,548 observada en segmentos de animales hipertensos tras el tratamiento con tempol no se debía a la disminución en la expresión de COX-2, analizamos la producción de prostanoïdes contráctiles que pueden ejercer sus efectos a través del receptor TP, para determinar si los efectos observados con los fármacos se debían a una disminución en la actividad de COX-2.

El tratamiento con tempol disminuyó la producción del metabolito de la $\text{PGF}_{2\alpha}$, 13-14 dihidro 15-ceto $\text{PGF}_{2\alpha}$ en el medio de incubación de segmentos de ratas hipertensas. El inhibidor selectivo de COX-2, NS 398 (1 μM), no modificó la producción de 13-14 dihidro 15-ceto $\text{PGF}_{2\alpha}$ en el medio de incubación de segmentos de ratas SHR tratadas con tempol, como sucedió en el caso de segmentos de ratas SHR sin tratar. Por otro lado, el tratamiento con tempol aumentó la producción de 8-isoprostanos liberados por segmentos de ratas hipertensas y no modificó la inhibición observada del NS 398 sobre la producción de 8-isoprostanos tras la realización de la curva concentración-respuesta a fenilefrina (Fig. 60).

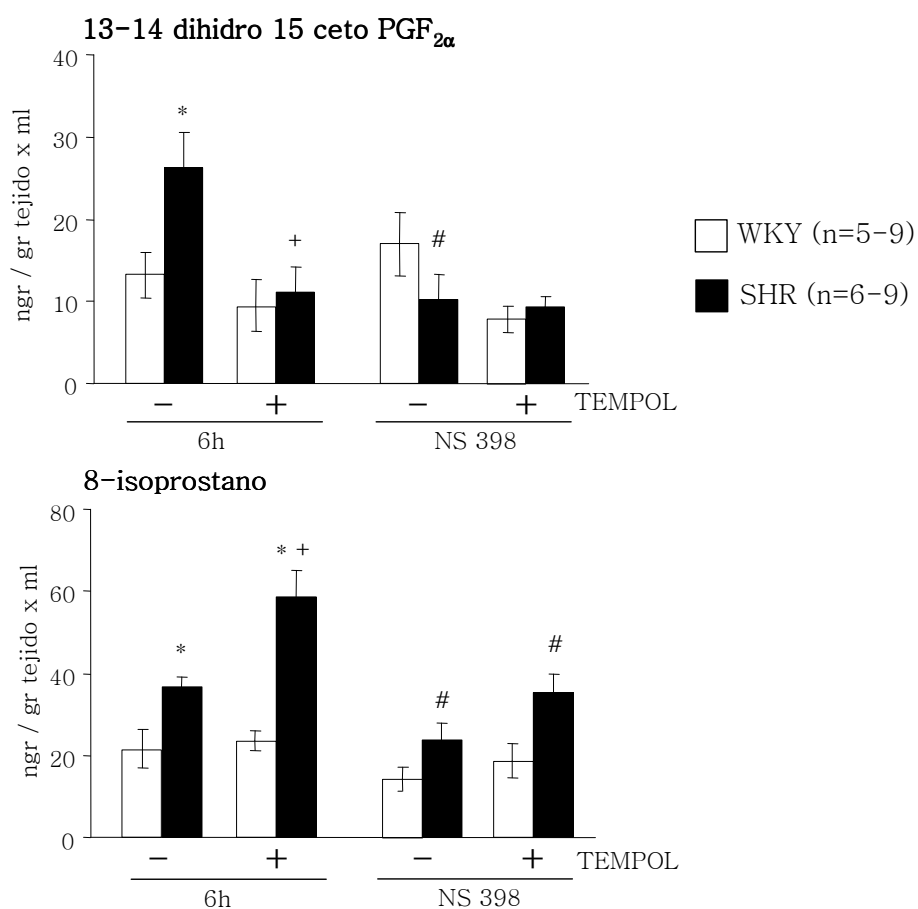


Fig. 60: Efecto del tratamiento con tempol (1 mM) sobre la liberación de 13,14-dihidro-15-ceto PGF_{2α} y de 8-isoprostanos en segmentos de aorta de ratas WKY y SHR sin tratar o tratadas con NS 398 (1 μM). A efectos comparativos, se muestran también los resultados obtenidos en las ratas sin tratar. Los resultados son media \pm ES. *p< 0,05 vs WKY. +p< 0,05 vs no tratadas. #p< 0,01 vs 6h por t de Student no pareada. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

6.6. Efecto del tempol sobre la producción de malondialdehído y el estado antioxidante total

El tratamiento con tempol no modificó los niveles de MDA y el TAS plasmáticos en ninguna de las dos cepas, de forma que los niveles de MDA siguieron siendo mayores en la cepa hipertensa y en el TAS no hubo diferencias entre cepas (Fig. 61)

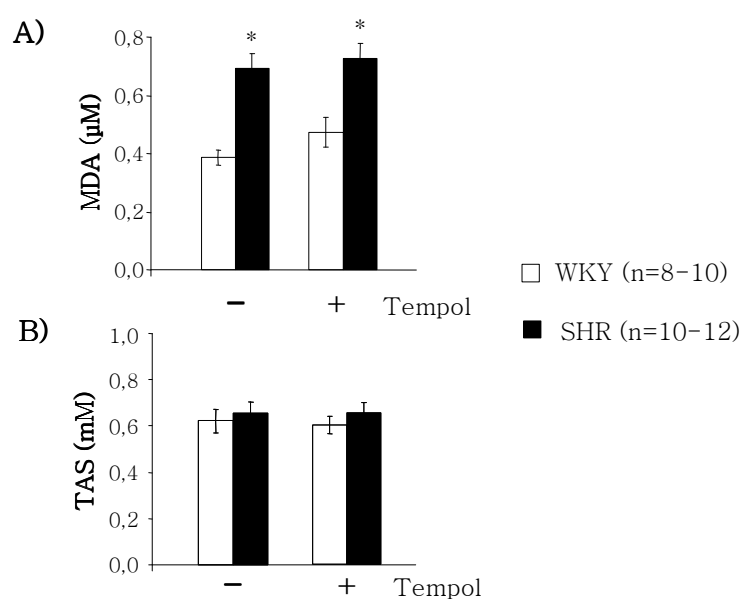


Fig. 61: Efecto del tratamiento con tempol (1mM) sobre A) la producción plasmática de malondialdehído (MDA) y B) el estado antioxidante total (TAS) plasmático de ratas WKY y SHR. * $p < 0,05$ vs WKY por t de Student no pareada. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

6.7. Efecto del tempol sobre la producción de H_2O_2 plasmático

Puesto que el tempol es un análogo de la SOD y transforma los $\text{O}_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 , y debido a que los niveles de MDA y el TAS no se vieron alterados por el tratamiento con tempol, determinamos los niveles de H_2O_2 en el plasma de animales sin tratar y tratados con tempol. Los niveles de H_2O_2 fueron mayores en el plasma de animales normotensos que en el de animales hipertensos, antes y después del tratamiento con tempol. El tratamiento con tempol incrementó los niveles de H_2O_2 en ambas cepas (Fig. 62).

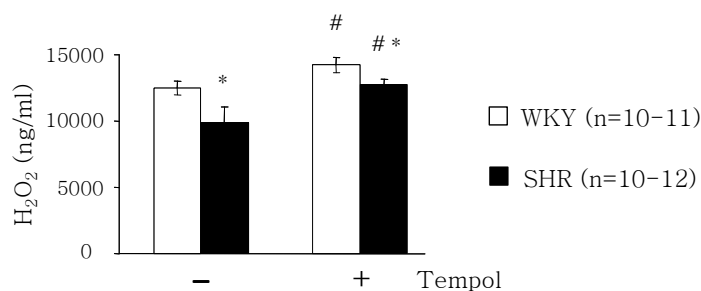


Fig. 62: Efecto del tratamiento con tempol (1mM) en la producción plasmática de H_2O_2 de ratas WKY y SHR. * $p < 0,05$ vs WKY. # $p < 0,05$ vs Tempol- por t de Student no pareada. Entre paréntesis se indica el número de animales utilizados en cada caso.

Los resultados obtenidos con los segmentos aórticos de ratas tratadas con tempol nos indican que el $\text{O}_2^{\cdot-}$ parece estar implicado en la mayor participación de prostanoides contráctiles de derivados de COX-2, probablemente a través de la regulación en la actividad de COX-2.

Discusión

Con la hipertensión se han descrito alteraciones en la actividad y en la expresión de las isoformas inducibles de la NOS (Wu y cols., 1996; Chou y cols., 1998; Vaziri y cols., 1998; Briones y cols., 2000) y de la COX (Henrion y cols., 1997; García-Cohen y cols., 2000), lo que sugiere que la producción de NO y prostanoïdes a partir de estas isoformas puede estar alterada. Además, en esta patología se ha observado una disminución en los niveles de proteínas como la SOD, que participan en el mantenimiento del estado antioxidante, y/o aumento de proteínas generadoras de $O_2^{\cdot-}$ como la NAD(P)H oxidasa (Zalba y cols., 2001; Vaziri y cols., 2005; Hector Polizio y Pena, 2005). El incremento en la actividad del SRA descrito con la hipertensión juega un papel fundamental en la formación de $O_2^{\cdot-}$ a través de la estimulación de la NAD(P)H oxidasa (Rajagopalan y cols., 1996; Toyuz y Schiffrin, 2000). Todas estas alteraciones podrían ser responsables de las variaciones en la liberación de los factores moduladores del tono vascular, y pueden, de esta manera, contribuir a la génesis y/o mantenimiento de diversos estados patológicos, como la hipertensión.

En este estudio hemos analizado el papel de las ROS y del NO y de prostanoïdes derivados de las isoformas inducibles de la NOS y la COX, respectivamente, en la respuesta contráctil inducida por fenilefrina en segmentos arteriales de aorta de ratas WKY y SHR. Además, hemos estudiado el papel de la AngII y del $O_2^{\cdot-}$ en la participación de prostanoïdes contráctiles en la respuesta contráctil a fenilefrina con la hipertensión.

La fenilefrina indujo una respuesta contráctil concentración-dependiente que fue similar en aorta de WKY y SHR, cuando los resultados se expresan en mg de tensión. Sin embargo, cuando los

resultados son expresados en porcentaje de la respuesta máxima inducida por K^+ , la respuesta a fenilefrina fue ligera, aunque significativamente mayor, en segmentos arteriales de ratas SHR, incremento que puede ser debido a la disminución de la contracción máxima a K^+ que observamos en esta cepa. La existencia de alteraciones en la función de canales de potasio durante la hipertensión (Cox, 2002), podría explicar estas diferencias en la respuesta contráctil a K^+ . El efecto de la hipertensión sobre las respuestas contráctiles va a depender del agente vasoactivo utilizado y del lecho vascular estudiado, así como del modelo experimental de hipertensión. Así, Dowell y cols. (1999) en aorta torácica y arteria carótida, y Dohi y cols. (1996) en arterias femorales, han descrito incremento de las contracciones inducidas tras la estimulación adrenérgica en ratas SHR-SP y SHR, respectivamente, debido a una disminución en la liberación de NO endotelial. Por otro lado, Zerrouk y cols. (1998) han asociado el incremento en la respuesta contráctil inducida por angiotensina II en aorta de SHR al incremento en la liberación de prostanoïdes contráctiles derivados de COX-2. Sin embargo, otros autores han descrito resultados diferentes en ratas con hipertensión inducida por administración crónica de ouabaina, en las que la respuesta a fenilefrina disminuye en aorta de ratas hipertensas (Rossoni y cols., 2002a), debido a un incremento en la liberación de NO a partir de las isoformas endotelial y neuronal de la NOS (Rossoni y cols., 2002b).

La eliminación del endotelio provocó un incremento en la respuesta inducida por fenilefrina, que fue mayor en segmentos de ratas normotensas. Estos resultados indican que el endotelio modula negativamente las contracciones a fenilefrina, y que este papel

modulador está alterado en animales hipertensos. De acuerdo con estos resultados, observamos que las relajaciones dependientes de endotelio inducidas por acetilcolina fueron significativamente mayores en aorta de ratas WKY que en las de SHR, como ha sido ampliamente descrito en diferentes lechos vasculares (Küng y Lüscher, 1995; Marín y Rodríguez-Martínez, 1997; Zhou y cols., 1999), aunque también se han descrito relajaciones dependientes de endotelio aumentadas (Dowell y cols., 1999) o no alteradas (Hutri-Kähönen y cols., 1999; Briones y cols., 2002a) con la hipertensión. La reducción en las relajaciones endotelio-dependientes puede ser debida a una disminución en la liberación de NO, a un aumento en su degradación o a una respuesta reducida a NO (Marín y Rodríguez-Martínez, 1997). Un exceso en la producción de O_2^- explicaría la disfunción endotelial dependiente de NO debido a una reducción en la disponibilidad de NO (Kerr y cols., 1999; Hamilton y cols., 2001). Otro mecanismo que puede afectar a la función vasodilatadora es la alteración en la activación de la GCs y la consecuente producción de GMPc. Así, Bauersachs y cols. (1998) y Ruetten y cols. (1999) han demostrado que la expresión de la GCs está disminuida en aorta de ratas SHR. Por otro lado, el incremento en la producción de prostanoïdes contráctiles derivados de endotelio en vasos procedentes de animales hipertensos podría enmascarar el efecto de factores dilatadores y participar, así, en las alteraciones de las relajaciones dependientes de endotelio (Lüscher y cols., 1990; Küng y Lüscher, 1995). En nuestro caso, no podemos determinar la causa por la que las relajaciones dependientes de endotelio están disminuidas con la hipertensión; sin embargo, este hecho puede estar relacionado con el incremento en la participación de prostanoïdes contráctiles en la respuesta a fenilefrina o con el

aumento en la producción de $O_2^{\cdot -}$ observados en la cepa hipertensa, como luego comentaremos.

1. Participación del NO sintetizado por iNOS en la respuesta a fenilefrina

Para analizar el papel del NO en la respuesta contráctil inducida por fenilefrina, incubamos segmentos intactos de aorta de ambas cepas con el inhibidor no selectivo de la NOS, L-NAME. Ese fármaco potenció la respuesta a fenilefrina en segmentos de aorta de WKY y SHR, lo que sugiere que la síntesis de NO está modulando negativamente la respuesta vasoconstrictora a fenilefrina, como ha sido descrito en distintos lechos vasculares y para diferentes agentes vasoconstrictores (Marquer-Domagala y Finet, 1997; Dowell y cols., 1999; Briones y cols., 2000; Rossoni y cols., 2002b). El hecho de que la potenciación inducida por L-NAME sea igual en ambas cepas indica que no existe, aparentemente, disfunción en la actividad de la NOS con la hipertensión.

Debido a que iNOS es una enzima que se induce con la inflamación (Nathan, 1997) y conociendo el proceso inflamatorio que se asocia con la hipertensión (Virdis y Schiffrin, 2003), se estudió la participación de NO derivado de iNOS en la respuesta a fenilefrina, con los inhibidores selectivos de esta isoforma, aminoguanidina y 1400W. Aminoguanidina incrementó la respuesta inducida por fenilefrina de forma similar en aorta de ambas cepas, lo que sugiere que el NO derivado de iNOS estaría participando en esta respuesta, y que su participación parece ser similar en animales normotensos e hipertensos. Boer y cols. (2000) han demostrado que la aminoguanidina es sólo nueve veces más potente inhibiendo iNOS que

eNOS, y sólo dos veces más específica para iNOS que para nNOS. Por tanto, el efecto producido por aminoguanidina en ambas cepas puede ser debido a la inhibición de otras isoformas de la NOS como la eNOS o la nNOS. Por su parte, el inhibidor selectivo de la nNOS, 7NI, no modificó la curva concentración–respuesta a fenilefrina en ninguna de las dos cepas, lo que descarta que el efecto potenciador observado con la aminoguanidina sea debido a que el fármaco esté inhibiendo la isoforma neuronal. Rossoni y cols. (2002a) encontraron que esta concentración de aminoguanidina no alteraba la relajación endotelio dependiente inducida por ACh en aorta de ratas Wistar, lo que permitiría descartar la inhibición de la isoforma endotelial por parte de aminoguanidina. Sin embargo, el hecho de que en presencia del inhibidor de la síntesis de proteínas, dexametasona, aminoguanidina siguiera potenciando la respuesta a fenilefrina sugiere que no podemos descartar que parte del efecto potenciador de la respuesta a fenilefrina observado con aminoguanidina sea debido a la inhibición de la isoforma endotelial, aunque tampoco se pueden descartar otros efectos de aminoguanidina.

El otro inhibidor selectivo de iNOS utilizado, 1400W, potenció la curva concentración–respuesta a fenilefrina únicamente en aorta de ratas WKY, potenciación que se abolió en presencia de dexametasona y con la eliminación del endotelio. Estos resultados sugieren que el NO derivado de iNOS, sintetizado a nivel endotelial, participa en la respuesta a fenilefrina sólo en segmentos de ratas WKY. Otros investigadores han descrito también participación de NO de iNOS en las respuestas vasoconstrictoras a fenilefrina en distintos lechos vasculares tras la incubación con LPS (O’Brien y cols., 2001; Wylam y cols., 2001). El hecho de que sólo se observe expresión de iNOS en

estas arterias tras 6 h de incubación en el baño de órganos, y no en condiciones basales, y que dicha expresión se inhiba con dexametasona, indica que dicha expresión puede ser atribuida, al menos en parte, a bajos niveles de endotoxina presentes en el medio de incubación, como han sugerido otros autores (Rees y cols., 1990; Alonso y cols., 1998). A pesar de que no observamos participación de NO derivado de iNOS en la respuesta inducida por fenilefrina en segmentos aórticos de ratas SHR, la expresión de esta isoforma en dicha cepa fue mayor que la observada en segmentos de WKY. Diferentes autores han descrito, asimismo, incrementos en la expresión de iNOS con la hipertensión en diferentes lechos vasculares. (Wu y cols. 1996; Chou y cols., 1998; Vaziri y cols., 1998; Briones y cols., 2000; 2002a). En determinados modelos animales de hipertensión, se ha observado un incremento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ que produce una disminución de la biodisponibilidad del NO (Boloumie y cols., 1997; Kerr y cols., 1999; Hamilton y cols., 2001), y que podría compensar una mayor producción de NO de iNOS en ratas hipertensas. Esta posibilidad será discutida en el siguiente apartado.

2. Participación de $O_2^{\cdot-}$ y de H_2O_2 en la respuesta a fenilefrina

Las especies reactivas de oxígeno, entre las que se encuentran el $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 , pueden modular el tono vascular, y estar implicadas en las alteraciones vasculares que ocurren en distintas patologías, como la hipertensión. El $O_2^{\cdot-}$, debido a su capacidad para inactivar al NO, tiene efectos vasoconstrictores (Tosaka y cols., 2002; Didion y Faraci, 2002); sin embargo, también se han descrito efectos vasodilatadores inducidos por $O_2^{\cdot-}$ (Marín y Rodríguez-Martínez, 1995). Por su parte, el H_2O_2 puede mediar vasodilatación por

liberación de NO, activación de canales de K⁺, o por hiperpolarización de la membrana plasmática (Gao y cols., 2003; Miura y cols., 2003), o puede producir contracción por inducir liberación de derivados de COX (Rodríguez-Martínez y cols., 1998).

Para analizar el papel del $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 en las respuestas contráctiles inducidas por fenilefrina, se preincubaron los segmentos de aorta con las enzimas SOD, que dismuta el $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 , y con catalasa que transforma el H_2O_2 en H_2O y O_2 . La SOD disminuyó la respuesta a fenilefrina en aorta de ratas SHR, lo que indica la participación de $O_2^{\cdot-}$ en dichas respuestas. De acuerdo con estos resultados, varios autores han descrito que el $O_2^{\cdot-}$ está implicado en la respuesta vasoconstrictora a serotonina (Srivastava y cols., 2002) o a noradrenalina (Ferrer y cols., 2003); además, la adición de sistemas generadores de $O_2^{\cdot-}$ a baños de órganos produce contracción en aorta de rata (Shen y cols., 1999), lo que nos indica que el $O_2^{\cdot-}$ estaría actuando como un factor vasoconstrictor. Otros autores, por el contrario, describen que no existe modulación de las respuestas contráctiles por parte del $O_2^{\cdot-}$ (Girouard y Champlain, 2004). Para excluir la posibilidad de que el efecto observado con SOD fuera debido al aumento en la formación de H_2O_2 producido por SOD a partir de $O_2^{\cdot-}$, se preincubaron los segmentos aórticos con catalasa y SOD. La combinación de ambos fármacos, no modificó la inhibición de la contracción a fenilefrina observada previamente con SOD; por lo que, podemos sugerir que dicho efecto se debe, efectivamente, a la eliminación del $O_2^{\cdot-}$ por la SOD. Por su parte, la catalasa por si sola, no tuvo ningún efecto sobre la respuesta a fenilefrina en ninguna de las dos cepas estudiadas, lo que sugiere que el H_2O_2 endógeno no media vasoconstricción inducida por fenilefrina. Como hemos

comentado, el H_2O_2 tiene efectos duales a nivel vascular, pudiendo producir tanto vasoconstricción como vasodilatación. Sin embargo, su participación en las respuestas a agentes vasoconstrictores no ha sido bien estudiada. Girouard y Champlain (2004) y Thakali y cols. (2005) han propuesto que el H_2O_2 endógeno no está implicado en la contracción inducida por fenilefrina ó ET-1. Sin embargo, otros estudios muestran que catalasa disminuye la respuesta contráctil a noradrenalina (Srivastava y cols., 2002; Ferrer y cols., 2003) debido a un aumento en la producción de NO. Por otra parte, observamos que la SOD disminuyó la respuesta contráctil a fenilefrina solamente en segmentos de ratas hipertensas. Asimismo, la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ también fue mayor en esta cepa. Varios estudios han descrito un aumento en la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ con la hipertensión (Kerr y cols., 1999; Dhalla y cols., 2000; Hamilton y cols., 2001; Zalba y cols., 2001; Püntmann y cols., 2005). También se ha descrito mayor modulación del $\text{O}_2^{\cdot-}$ en respuestas contráctiles a agonistas adrenérgicos con la hipertensión (Hu y cols., 1998; Briones y cols., 2002b) y con otras patologías como la diabetes (Tesfamariam, 1994).

Los efectos vasoconstrictores inducidos por $\text{O}_2^{\cdot-}$ pueden ser mediados por la inactivación del NO y a su vez, la biodisponibilidad de NO puede estar disminuida cuando aumenta la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Kerr y cols., 1999; Zalba y cols., 2001; Touyz, 2004b). Se ha descrito que el $\text{O}_2^{\cdot-}$ reacciona con el NO para formar ONOO^- con mayor rapidez que la reacción llevada a cabo por la SOD para dismutar el $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Naseem, 2005). Como hemos comentado previamente, la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible fue mayor en arterias de animales hipertensos; sin embargo, el NO derivado de esta isoforma de la NOS no parecía estar implicada en la respuesta contráctil inducida por

fenilefrina. Para analizar la posibilidad de que la mayor producción de $O_2^{\cdot-}$ observada en aorta de SHR estuviera inactivando el NO de iNOS, preincubamos los segmentos simultáneamente con SOD y el inhibidor selectivo de iNOS, 1400W. Como hemos descrito anteriormente, en segmentos de ratas hipertensas, el 1400W por si solo no modificó la respuesta a fenilefrina; sin embargo, cuando se eliminaron los $O_2^{\cdot-}$ por preincubación con SOD, 1400W potenció la respuesta a fenilefrina en aorta de animales hipertensos, potenciación que fue mayor que la que se obtuvo en animales normotensos. Estos resultados indican que el incremento en la producción de NO de iNOS en los segmentos de animales hipertensos, se contrarresta con el aumento en la producción de $O_2^{\cdot-}$, y ello explicaría la falta de participación del NO de iNOS en las respuestas contráctiles.

El aumento del estrés oxidativo descrito con la hipertensión puede deberse tanto a un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno como a una disminución en su metabolismo, debida a la disminución en las enzimas detoxificadoras como la SOD, la catalasa, y la glutathion peroxidasa (Redón y cols., 2003; Hector-Polizio y Peña, 2005). Las fuentes vasculares de $O_2^{\cdot-}$ varían en los diferentes tipos de vasos de diferentes especies, habiéndose descrito en la mayoría de estudios que la NAD(P)H oxidasa es la principal fuente de $O_2^{\cdot-}$ a nivel vascular (Griendling y cols., 2000; Didion y Faraci, 2003; Cai y cols., 2003). Se ha sugerido que la NAD(P)H oxidasa puede jugar un papel importante en el control del tono vascular a través de la producción de $O_2^{\cdot-}$ (Souza y cols., 2001). En este estudio hemos observado que apocinina, un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa, disminuyó las respuestas vasoconstrictoras a fenilefrina en mayor medida en segmentos de ratas hipertensas, de

forma similar a lo observado con la SOD, mientras que alopurinol, un inhibidor de la xantina oxidasa no modificó la respuesta en ninguna de las dos cepas. Por otra parte, apocinina disminuyó la producción de $O_2^{\cdot-}$ en anillos de aorta. Estos resultados apuntan a la NAD(P)H oxidasa como la enzima responsable de la producción de $O_2^{\cdot-}$ en vasos de animales hipertensos. Otros investigadores han observado que las contracciones inducidas por angiotensina II (Püntmann y cols., 2005) así como el tono espontáneo en aorta de ratas hipertensas DOCA-sal (Ghosh y cols., 2004) disminuyen también con inhibidores de la NAD(P)H oxidasa. El incremento en la actividad de la NADP(H) oxidasa con la hipertensión (Dhalla y cols., 2000; Hamilton y cols., 2001; Zalba y cols., 2001; Cruzado y cols., 2005) puede ser el responsable de esas observaciones, incremento que puede ser debido a un aumento en la expresión de las diferentes subunidades de la NAD(P)H oxidasa como p22phox, gp91, p47phox, p67phox (Ulker y cols., 2003; Vaziri y Ni, 2005).

3. Participación de prostanoïdes sintetizados por COX-2 en la respuesta a fenilefrina

Los prostanoïdes sintetizados por la COX a partir del AA, participan en la regulación del tono vascular, tanto a nivel basal como tras la estimulación con diferentes agonistas (Dellipizi y cols., 1997). Para comprobar su participación en las respuestas a fenilefrina, incubamos los segmentos de aorta con el inhibidor no selectivo de la COX, indometacina. Este fármaco produjo una disminución de la respuesta a fenilefrina en arterias de ambas cepas, siendo este efecto superior en la aorta de ratas SHR. Estos resultados sugieren que el efecto contráctil de fenilefrina está mediado, al menos en parte, por prostanoïdes contráctiles derivados de COX, y que esta participación

está aumentada con la hipertensión. Otros autores también han descrito en arterias de animales hipertensos un incremento en la participación de prostanoïdes contráctiles en las contracciones producidas por agentes vasoactivos como endotelina-1 (Taddei y Vanhoutte, 1993), AngII (Zerrouk y cols., 1998), noradrenalina (Zerrouk y cols., 1997; Dantas y cols., 1999; Adeagbo y cols., 2005) o ionóforos de calcio (Lin y Nasjletti, 1992), así como en la contracción inducida por elevadas concentraciones de acetilcolina (Rapoport y cols., 1996; Zhou y cols., 1999). Asimismo, las contracciones inducidas por H₂O₂, que están mediadas por prostanoïdes contráctiles derivados de la COX, están incrementadas en arterias de animales hipertensos (Rodríguez-Martínez y cols., 1998).

Los prostanoïdes son sintetizados por la ciclooxigenasa, de la que se conocen dos isoformas, COX-1 que es constitutiva y se expresa en la mayoría de las células, y COX-2 cuya expresión se induce por citoquinas y endotoxinas bacterianas. Para determinar si los prostanoïdes que estaban participando en la respuesta mediada por fenilefrina procedían de la isoforma inducible, los segmentos arteriales se incubaron con el inhibidor selectivo de COX-2, NS 398. Los resultados obtenidos con NS 398, así como los observados con el inhibidor de la síntesis de proteínas, dexametasona, fueron similares a los observados con indometacina: una disminución de las respuestas contráctiles inducidas por fenilefrina que fue más acusada en segmentos de ratas hipertensas. Además, dexametasona abolió los efectos inhibitorios inducidos por NS 398 en arterias de ambas cepas. Por tanto, los resultados obtenidos con estos fármacos indican que los prostanoïdes contráctiles implicados en la respuesta a fenilefrina son sintetizados a partir de la isoforma inducible de la COX, y confirman la

mayor participación de estos prostanoides en dicha respuesta con la hipertensión. Resultados similares obtuvieron Zerrouk y cols. (1998) en aorta de ratas SHR, y Adeagbo y cols. (2005) en aorta de ratas con hipertensión inducida con acetato de deoxicorticosterona (DOCA) en las que se observó un incremento de la participación de prostanoides contráctiles derivados de endotelio y sintetizados por COX-2 en la respuesta contráctil inducida por angiotensina II y noradrenalina, respectivamente.

Para estudiar si la mayor participación de derivados de la COX-2 en las respuestas contráctiles de las arterias de animales hipertensos se debía a alteraciones en la expresión de esta proteína, se evaluó la expresión de su ARNm por PCR-RT y de la proteína por Western blot. Nuestros resultados mostraron expresión de ARNm y de proteína de COX-2 en condiciones basales, que aumentó tras la realización de los experimentos de reactividad vascular, y que, en ambas condiciones, la expresión estaba incrementada en la cepa hipertensa. Estos resultados sugieren que el incremento de la expresión de COX-2 en la cepa hipertensa puede ser la responsable del aumento de la participación de prostanoides contráctiles en la respuesta a fenilefrina con la hipertensión. De acuerdo con nuestros resultados, algunos autores han descrito también un incremento en la expresión basal de COX-2 en arterias de ratas hipertensas (Henrion y cols., 1997; García-Cohen y cols., 2000; Briones y cols., 2002b; Adeagbo y cols., 2005), que además, aumenta tras la incubación del tejido en Krebs-Henseleit (Hernanz y cols., 2003). Por otra parte, Bishop-Bailey y cols. (1997) detectaron mRNA de COX-2 en preparaciones de aorta con y sin endotelio, sugiriendo la posibilidad de que esta isoforma se exprese de forma constitutiva en el lecho

vascular. Además, nuestros resultados mostraron que la expresión de la proteína disminuyó en segmentos de ratas SHR en presencia de dexametasona, lo que indica una inducción de COX-2 a lo largo del experimento. De acuerdo con esto, Zerrouk y cols. (1998) encontraron que NS 398 disminuía las respuestas inducidas por AngII a las 5 h de incubación pero no a las 2 h. No conocemos la naturaleza del estímulo envuelto en la inducción de COX-2 en nuestros experimentos, aunque algunos investigadores han sugerido que bajos niveles de LPS detectados en la solución de incubación pueden ser responsables de la inducción de COX-2 (Knowles y cols., 1990). Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que otros factores, como el trauma al extraer la aorta, provoquen la inducción (Charette y cols., 1995).

Se ha descrito expresión de COX-2 en las diferentes capas de diferentes vasos con daño vascular (Yamada y cols., 2002) y expuestos a LPS bacteriano (Hernanz y cols., 2003). Los experimentos de expresión de COX-2 por inmunohistoquímica mostraron expresión de dicha proteína en células endoteliales y en células adventiciales en aorta de ratas WKY y SHR. Algunas de las células adventiciales marcadas con el anticuerpo de COX-2 fueron, además, marcadas con el anticuerpo de vimentina. Esta colocalización de anticuerpos indicaba que fibroblastos adventiciales expresaban COX-2; sin embargo, algunas de las células adventiciales marcadas con el anticuerpo de COX-2 no colocalizaban con vimentina, sugiriendo que otras células de la adventicia, probablemente macrófagos, también expresaban COX-2.

Con el fin de determinar la procedencia de los prostanoideos contráctiles que están participando en la respuesta a fenilefrina, se realizaron experimentos en segmentos a los que se retiró, o bien la

capa adventicial o bien la capa endotelial. En los segmentos en los que se retiró la capa adventicial, el NS 398 disminuyó la respuesta contráctil a fenilefrina de forma similar a la inhibición observada en segmentos con adventicia, indicando que los prostanoïdes que se pueden generar en esta capa no están participando en la respuesta contráctil inducida por fenilefrina. En el caso de segmentos en los que se eliminó el endotelio, se revirtió casi totalmente el efecto inhibitor del NS 398 sobre la respuesta a fenilefrina en aorta de ambas cepas, sugiriendo que la síntesis de prostanoïdes contráctiles derivados de COX-2 que participan en la respuesta contráctil a fenilefrina se produce, fundamentalmente, en el endotelio. Contrariamente a nuestros resultados, otros investigadores han observado en aorta de ratas sin endotelio que un inhibidor selectivo de COX-2 disminuía las respuestas a agonistas adrenérgicos, probablemente debido a la disminución de la formación de prostanoïdes en el músculo liso por la COX-2 (Connolly y cols., 1998). Por otra parte, la expresión de COX-2 en segmentos sin endotelio no fue diferente de la encontrada en segmentos con endotelio; a pesar de que los resultados obtenidos con NS 398 en ausencia de endotelio sugieren que los prostanoïdes que están actuando en la respuesta mediada por fenilefrina parecen producirse en el endotelio. Es posible que la disminución en la expresión de COX-2 tras la retirada del endotelio, no haya podido ser detectada con esta técnica debido a la gran cantidad de proteína que se expresa en las células adventiciales de los vasos.

De los resultados anteriores se puede sugerir, que prostanoïdes contráctiles sintetizados en el endotelio por la isoforma inducible de COX están modulando positivamente la respuesta a fenilefrina, y que esta modulación se incrementa con la hipertensión. Se ha descrito que

TXA₂ participa en respuestas vasoactivas en arteria carótida (Zhou y cols., 1999) y en aorta de ratas hipertensas (Lin y cols., 1992; Taddei y Vanhoutte, 1993; Hibino y cols., 1999). Para explorar la posibilidad de que en nuestras condiciones experimentales el prostanoide implicado en la respuesta a fenilefrina fuera el TXA₂, se utilizó SQ 29,548, un inhibidor del receptor TP, a través del que actúa este prostanoide, y dos inhibidores de la tromboxano A₂ sintasa, furegrelato y OKY 046. Al igual que indometacina y NS 398, SQ 29,548 disminuyó las respuestas contráctiles a fenilefrina, en mayor medida en arterias de ratas hipertensas. Estos resultados indican que los prostanoide que están participando en la vasoconstricción inducida por fenilefrina ejercen su acción a través de unión al receptor TP. Sin embargo, el hecho de que los dos inhibidores de la tromboxano A₂ sintasa utilizados no afectaran a las contracciones a fenilefrina en ninguna de las dos cepas, descarta la participación de TXA₂ en estas contracciones.

Además de TXA₂, se ha descrito que PGF_{2α}, PGH₂, PGE₂, PGI₂, así como isoprostanos pueden mediar vasoconstricción a través de unión al receptor TP (Dorn y cols., 1992; Williams y cols., 1994; Wagner y cols., 1997; Kromer y Tippins, 1998; Blanco-Rivero y cols., 2005); por tanto, estos mediadores podrían estar implicados en la respuesta a fenilefrina. Se ha observado que PGF_{2α} es liberado por células endoteliales de cordón umbilical (Camacho y cols., 1998) y de microvasos cerebrales (Mark y cols., 2001) tras la inducción de COX-2 con IL-1β y TNF-α, respectivamente. Además, la liberación de este prostanoide se incrementa tras la estimulación con noradrenalina en el lecho mesentérico de ratas SHR ovariectomizadas (Dantas y cols., 1999). En nuestras condiciones experimentales, los siguientes

resultados apuntan a que este prostanoide está involucrado en la respuesta a fenilefrina, y que su participación es mayor en animales hipertensos: 1) el incremento en la liberación de $\text{PGF}_{2\alpha}$, determinada por la producción de su metabolito, 13,14-dihidro-15-ceto $\text{PGF}_{2\alpha}$, que observamos en el medio de incubación tras realizar la curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de aorta de ambas cepas; 2) en aorta de ratas normotensas e hipertensas, la $\text{PGF}_{2\alpha}$ indujo una respuesta contráctil que fue inhibida por SQ 29,548 (datos no mostrados); 3) la producción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ fue mayor en el medio de incubación de anillos de ratas hipertensas, y 4) NS 398 disminuyó la liberación de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Por otro lado, los niveles de 8-isoprostanos también fueron mayores en el medio de incubación de segmentos de animales hipertensos, lo que sugiere que estos mediadores también podrían estar implicados en la mayor respuesta inducida por fenilefrina en aorta de ratas SHR. Además, NS 398 redujo los niveles de 8-isoprostanos, lo que indica que COX-2 podría estar participando en la formación de estos mediadores. Varios autores han descrito la posible participación de COX en la formación de isoprostanos, aparte de la reacción no enzimática llevada a cabo por radicales libres (Pratico y FitzGerald, 1996; Klein y cols., 1997; Jourdan y cols., 1997; Klein y cols., 2001). Otros investigadores han observado un incremento de los niveles de 8-iso- $\text{PGF}_{2\alpha}$ en orina, abolido por NS 398, en ratas con hipertensión inducida por L-NAME (Tomida y cols., 2003).

La mayor participación de prostanoideos de naturaleza contráctil con la hipertensión podría explicarse también por una producción de PGI_2 disminuida en segmentos de ratas SHR; de hecho, la PGI_2 es el principal prostanoide generado por COX-2 (Cheng y cols., 2002). Sin

embargo, esta hipótesis quedó descartada al observar que la producción de PGI_2 fue mayor en aorta de SHR y que NS 398 disminuyó la producción de PGI_2 en segmentos de ratas hipertensas. Blanco-Rivero y cols. (2005) han demostrado recientemente que la PGI_2 puede actuar como un prostanoides de naturaleza contráctil a través del receptor TP, por lo que PGI_2 podría estar involucrado, además de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y 8-isoprostanos, en la respuesta contráctil inducida por fenilefrina. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que otros prostanoides como PGE_2 y PGH_2 estén participando en el incremento de la respuesta contráctil a fenilefrina en segmentos de aorta de ratas hipertensas.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que un incremento en la liberación de $\text{PGF}_{2\alpha}$, 8-isoprostanos y, probablemente, PGI_2 , sintetizados en el endotelio a partir de la isoforma inducible de la COX, es responsable de la mayor participación de prostanoides contráctiles en la respuesta vasoconstrictora inducida por fenilefrina en segmentos de aorta de ratas SHR. Otros investigadores han descrito que la hipertensión aumenta la sensibilidad de la maquinaria contráctil a los prostanoides (Ge y cols., 1995; Ungvari y Koller, 2000), por lo que se puede sugerir que una mayor producción o sensibilidad a los prostanoides contráctiles con la hipertensión, podría estar implicada en la alteración de las respuestas vasculares que ocurre en esta patología.

4. Papel del sistema renina-angiotensina en la producción vascular de derivados de COX-2

Como se ha comentado en la introducción, el SRA juega un importante papel en la patogénesis de varias enfermedades

cardiovasculares, como la hipertensión. En este estudio, se observó que el antagonista del receptor AT_1 de la AngII, losartán, disminuyó significativamente la presión arterial en ratas hipertensas. Como han observado otros investigadores, se han propuesto varios mecanismos como responsables del efecto hipertensinogénico de la AngII. Así, se ha demostrado que AngII induce hiperplasia e hipertrofia en células musculares lisas vasculares (Touyz y cols., 1999), y que participa en los procesos profibróticos (Laviades y cols., 1998), así como en las alteraciones de las respuestas vasoconstrictoras y vasodilatadoras observadas con la hipertensión (Schiffrin y Touyz, 2004). Además, también se ha sugerido que la AngII participa en los procesos inflamatorios vasculares asociados a la hipertensión (Schiffrin y Touyz, 2004).

A lo largo del capítulo anterior, hemos discutimos los resultados que sugerían mayor participación de prostanoïdes contráctiles derivados de COX-2 en la vasoconstricción inducida por fenilefrina con la hipertensión. Así, habíamos observado que el inhibidor selectivo de COX-2, NS 398, el inhibidor de la síntesis de proteínas, dexametasona, y el antagonista del receptor del TXA_2/PGH_2 , SQ 29,548, disminuían la respuesta a fenilefrina en mayor medida en aorta de ratas SHR. Además, observamos que las expresiones de proteína y de ARNm de COX-2, además de la producción de $PGF_{2\alpha}$ y 8-isoprostanos, estaban incrementadas con la hipertensión. Diversos autores, han observado que AngII modula la producción de prostaglandinas por regulación de la expresión de COX-2; sin embargo, se han encontrado resultados contradictorios dependiendo del tipo celular y del estímulo. Así, en células musculares lisas (Ohnaka y cols., 2000; Young y cols., 2000; Hu y cols., 2002),

cardiomiocitos ventriculares (Rebsamen y cols., 2003) y en arterias coronarias (Rocha y cols., 2002), AngII incrementa la expresión del ARNm de COX-2 a través de la activación del receptor AT₁ (Ohnaka y cols., 2000; Hu y cols., 2002). Sin embargo, también hay evidencias que muestran que AngII atenúa la expresión de COX-2 en riñón (Harris y cols., 2004) y en células musculares lisas estimuladas con IL-1 β (Jiang y cols., 2004). Nuestros resultados muestran que el tratamiento con losartán disminuye el efecto inhibitorio de NS 398, dexametasona, y SQ 29,548 sobre la respuesta contráctil inducida por fenilefrina en segmentos de aorta de ratas hipertensas, pero no en los de ratas normotensas. Además, el tratamiento con losartán redujo el incremento en las expresiones de proteína y ARNm de COX-2 observado en aorta de ratas SHR. Por otro lado, la liberación de PGF_{2 α} y 8-isoprostanos también disminuyó en segmentos de ratas hipertensas tratadas con losartán y, en estas condiciones, NS 398 no modificó la producción de prostanoïdes. Todos estos resultados sugieren que AngII, a través de su receptor AT₁, participa en el incremento de la participación de prostanoïdes contráctiles derivados de COX-2 en la respuesta a fenilefrina en aorta de ratas hipertensas, y que este efecto es debido a la modulación de la expresión de COX-2. De acuerdo con estos resultados, se ha observado disminución en la expresión de COX-2 e iNOS tras el tratamiento con losartán en un modelo animal experimental de fibrosis renal (Manucha y cols., 2004). Sin embargo, otro antagonista del receptor AT₁ como es el candesartán, incrementa la expresión de COX-2 en la corteza renal de ratas SHR de cinco semanas de edad, aunque no altera la expresión en ratas viejas (Hoherl y cols., 2001).

A pesar de la reducción en la participación de prostanoideos contráctiles derivados de COX-2 en las respuestas a fenilefrina tras el tratamiento con losartán, no hubo diferencias en las respuestas a fenilefrina entre ratas con y sin tratamiento con losartán. Es posible que AngII pueda estar regulando, además de la vía de la COX-2, la producción de otros factores vasoactivos que participen en la respuesta a fenilefrina y cuya naturaleza no se ha determinado en este estudio. Se necesitarían investigaciones adicionales para analizar esta hipótesis.

Como se ha comentado en la introducción, se ha relacionado al estrés oxidativo con la patogénesis de la hipertensión (Griendling y cols., 2000b; Schifffrin y Touyz, 2004). Los resultados aquí presentados muestran niveles incrementados de anión superóxido y de MDA, un producto de la peroxidación lipídica, en aorta y plasma, respectivamente, de animales hipertensos, lo que nos permite relacionar el estrés oxidativo a un estado hipertensivo, al igual que han descrito otros grupos (Zalba y cols., 2000; Duarte y cols., 2001). Por otro lado, no se observaron alteraciones en el TAS con la hipertensión, descartando una disminución en las defensas antioxidantes como responsable del incremento en el estrés oxidativo observado con este modelo de hipertensión. Algunos estudios han mostrado que no hay variación en el TAS (Digiesi y cols., 1997; Mantle y cols., 2000); sin embargo, otros han mostrado que el TAS está reducido en plasma de pacientes y animales hipertensos (Donmez y cols., 2002; Newaz y cols., 2005). Por su parte, el incremento en el estrés oxidativo observado con la hipertensión puede reducir la biodisponibilidad del NO y, contribuir de esta forma a la disfunción endotelial observada en este estudio y ampliamente descrita tanto en

la hipertensión humana como experimental (Rajagopalan y cols., 1996; Cheng y cols., 2005).

Se ha propuesto que la AngII media sus acciones celulares a través de las ROS, participando de ese modo en el incremento del estrés oxidativo observado con la hipertensión (Virdis y Schiffrin, 2003; Schiffrin y Touyz, 2004; Cheng y cols., 2005). AngII estimula la producción de $O_2^{\cdot-}$ en anillos de aorta a través de la activación de su receptor AT_1 (Rajagopalan y cols., 1996), y en células musculares lisas a través del incremento en la actividad de la NAD(P)H oxidasa (Griendling y cols., 1994; Cruzado y cols., 2005), en mayor medida en ratas SHR (Cruzado y cols., 2005). En los resultados aquí mostrados observamos que el tratamiento con losartán disminuyó el incremento de los $O_2^{\cdot-}$, normalizó el incremento de los niveles de MDA plasmático e incrementó el TAS, indicando la participación de la AngII a través del receptor AT_1 , en el incremento del estrés oxidativo observado con la hipertensión. Otros investigadores también han observado disminución de los niveles plasmáticos de MDA y de los niveles en plasma y orina de 8-isoprostanos, así como incremento de los sistemas antioxidantes después de la inhibición del SRA (Donmez y cols., 2002; Mervaala y cols., 2001; Chamorro y cols., 2004).

Por otro lado la activación del sistema renina-angiotensina en la cepa hipertensa y la subsecuente producción de especies reactivas de oxígeno, puede ser un factor importante en la disfunción endotelial. De hecho, el tratamiento con losartán mejoró las relajaciones endotelio-dependientes tanto en ratas normotensas como en ratas hipertensas, al igual que describieron Rajagopalan y cols. (1996). Autores como Zalba y cols. (2001) sugieren que la disminución de las relajaciones dependientes de endotelio con la hipertensión es debida a un

incremento en los niveles de $O_2^{\cdot-}$ mediado por activación de NAD(P)H oxidasa, y que el sistema renina-angiotensina estaría involucrado en dicho incremento.

Se ha descrito que el estrés oxidativo puede modular la expresión de COX-2. Así, García-Cohen y cols. (2000), describieron que el estrés oxidativo inducido por *terbutil hidroperóxido* incrementaba la expresión de COX-2, y que este incremento era mayor en aorta de ratas SHR que de ratas WKY. Otros grupos han observado también un incremento en la expresión de COX-2 después de la inducción de estrés oxidativo (Feng y cols., 1995; Kiritoshi y cols., 2003) y disminución en la expresión de COX-2 después del tratamiento con antioxidantes (Li y cols., 2005). Se ha sugerido que el estrés oxidativo es uno de los mecanismos que participan en la producción de prostanoïdes contráctiles derivados de COX-2, incrementando así la reactividad vascular a diversos vasoconstrictores en aorta y riñón de ratas hipertensas DOCA-sal (Adeagbo y cols., 2005) y de ratas diabéticas (Li y cols., 2005). Además, en células mesangiales las ROS están implicadas en el aumento de la expresión de COX-2 y en la producción de prostanoïdes inducidos por AngII (Jaimes y cols., 2005). Estas evidencias, junto con todo lo anteriormente discutido, hacen pensar que el estrés oxidativo inducido por AngII puede ser responsable del incremento en la expresión de COX-2, y del incremento en la liberación de prostanoïdes contráctiles derivados de COX-2 observados con la hipertensión.

5. Papel de los aniones superóxido en la producción vascular de derivados de COX-2

Como se ha comentado anteriormente, el $O_2^{\cdot-}$ puede jugar un importante papel en situaciones fisiopatológicas como la hipertensión, en la que se ha descrito un incremento del estrés oxidativo, que puede estar afectando a la función endotelial (Zalba y cols., 2001). Por otro lado, en este estudio hemos observado que la hipertensión incrementa la participación de prostanoides contráctiles derivados de COX-2 a través de un incremento en la expresión de dicha enzima. COX-2 es un gen redox sensible, cuya expresión puede estar modulada por especies reactivas de oxígeno. Así, $O_2^{\cdot-}$ puede estar participando en la regulación de la expresión de COX-2 observada en diferentes células (Feng y cols., 1995; Von Knethen y cols., 1999). A nivel vascular, se ha descrito un aumento de la expresión de COX-2 con el estrés oxidativo (García-Cohen y cols., 2000). Además, la liberación de derivados de COX-2 en células estimuladas con LPS también está regulada por $O_2^{\cdot-}$ (Martínez y cols., 2000). Con todos estos antecedentes, quisimos analizar el papel del $O_2^{\cdot-}$ en el aumento de la participación de prostanoides contráctiles derivados de COX-2. Para ello, tratamos ratas WKY y SHR con tempol, un análogo de la SOD que transforma el $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 .

El tratamiento con tempol disminuyó la presión arterial tanto en ratas hipertensas como en ratas normotensas, sugiriendo un importante papel del $O_2^{\cdot-}$ en el mantenimiento de la presión arterial. Otros autores han descrito reducciones de la presión arterial en otros modelos de hipertensión (Beswick y cols., 2001; Zhang y cols., 2003; Beltowski y cols., 2005). La disminución de la presión

arterial en tratamientos con tempol en diferentes modelos de hipertensión se ha asociado a una disminución en la producción de O_2^- y a un aumento en el estado antioxidante total (Park y cols., 2002; Yanes y cols., 2005), así como a un aumento en la biodisponibilidad de NO (Yanes y cols., 2005). En otros estudios, el tratamiento con antioxidantes como las vitaminas C y E afecta la actividad de las enzimas generadoras de O_2^- como la NAD(P)H oxidasa, disminuyéndola y, en consecuencia, mejorando el estado oxidante (Chen y cols., 2001). En nuestro estudio, el tratamiento con tempol, sin embargo, no modificó los niveles de MDA ni el estado antioxidante total ni en WKY ni en SHR, a pesar de observar una disminución en la presión arterial. Estos resultados resultan contradictorios con lo observado en la literatura, en la que existen claras evidencias de que tratamientos con tempol y otros antioxidantes disminuyen los niveles de O_2^- , MDA y de 8-isoprostanos, un marcador de estrés oxidativo, y aumentan el estado antioxidante total (Chen y cols., 2001; Park y cols., 2002; Courtois y cols., 2003; Yanes y cols., 2004; Moreno y cols., 2005). Sin embargo, recientemente, Xu y cols. (2004) han observado que en aorta y en vena cava de ratas hipertensas DOCA-sal tratadas con tempol, los niveles de O_2^- no cambian. El aumento en la concentración plasmática de H_2O_2 que observamos en ratas tratadas con tempol podría explicar tanto el mantenimiento del estado oxidante como la disminución de la presión arterial con dicho tratamiento, debido a los efectos vasorelajantes del H_2O_2 (Hayabuchi y cols., 1998; Fujimoto y cols., 2001; Gao y cols. 2003; Koller y Bagi, 2004). Otros autores también han observado un aumento de los niveles de H_2O_2 en tratamientos realizados con

tempol (Chen y cols., 2003; Williams y cols., 2004). Por otro lado, recientemente se ha observado en diferentes modelos de hipertensión y en animales normotensos, que el tempol posee importantes acciones farmacológicas sobre la función simpática y la presión sanguínea que son independientes de la disminución del O_2^- o del aumento de la biodisponibilidad del NO (Zang y cols., 2003; Shokoji y cols., 2003; Xu y cols., 2004). La mejora del remodelado vascular (Park y cols., 2002) descrito en ratas SHR-SP tras el tratamiento con tempol, podría ser responsable de la disminución de la presión arterial. Sin embargo, el mecanismo por el que el tempol disminuye la presión arterial no está del todo establecido.

Otro resultado sorprendente es que las relajaciones endotelio dependientes a acetilcolina, no mejoraron con el tratamiento de tempol en aorta de ratas SHR. En los últimos años se han descrito diferentes resultados contradictorios en este sentido; así, tempol incrementa las respuestas vasodilatadoras a acetilcolina en arterias de ratas hipertensas con disfunción endotelial (Adeagbo y cols., 2003) y de ratas resistentes a insulina (Viswanad y cols., 2006); sin embargo, otros autores encuentran que el tempol no mejora las relajaciones endotelio dependientes (Park y cols., 2002; Nakano y cols., 2003) o incluso que las empeora (Preti y cols., 2005). El incremento en los niveles de H_2O_2 plasmáticos observado tras el tratamiento con tempol, también podría explicar la falta de efecto sobre las deterioradas relajaciones dependientes de endotelio de animales hipertensos, como describieron Chen y cols. (2003).

Por otra parte, el tratamiento con tempol disminuyó el efecto inhibitorio de NS 398, SQ 29,548 y dexametasona sobre la respuesta contráctil a fenilefrina en ratas hipertensas, comparando con el efecto

observado en ratas sin tratar, lo que sugiere una disminución en la participación de prostanoïdes contráctiles derivados de COX-2 en la contracción inducida por fenilefrina. Algunos autores han descrito modulación de la expresión de COX-2 por ROS (García Cohen y cols., 2000; Cosentino y cols., 2003; Kiritoshi y cols., 2003). El NFκB es un factor de transcripción que juega un papel importante en la inducción de la respuesta inmune y de la inflamación, a través de la regulación de la expresión de un gran número de citoquinas y de otros genes involucrados en la respuesta inmune, como es COX-2 (Tanabe y Tohnai, 2002). Las especies reactivas de oxígeno potencian la señal de las vías de transducción para la activación del NFκB en el citoplasma y su translocación al núcleo (Kabe y cols., 2005). Se ha descrito que el tratamiento con un inhibidor del NFκB mejora la presión arterial de ratas SHR y disminuye la inflamación renal y la expresión de moléculas de adhesión celular (Rodríguez-Iturbe y cols., 2005). Por tanto, es posible que la activación redox-sensible de NFκB pueda estar involucrada en la modulación de la expresión de COX-2. Algunos autores han descrito una disminución de la expresión renal de COX-2 en ratas diabéticas tratadas con tempol (Li y cols., 2005) y en aorta de ratas con hipertensión inducida por plomo tratadas con vitamina C (Courtois y cols., 2003). Otros, sin embargo, han descrito un incremento en la expresión de COX-2 en células musculares lisas vasculares estimuladas con IL-1β tratadas con el antioxidante pirrolidin ditiocarbamato (Fang y cols., 2002). En nuestro estudio, la expresión de ARNm y de proteína de COX-2, tanto en condiciones basales como después de la incubación de los segmentos en las mismas condiciones que los experimentos de reactividad vascular, se mantuvieron después del tratamiento con tempol. Algunos estudios

han mostrado, en células endoteliales humanas y en macrófagos de ratón, que la vitamina E disminuye la actividad de COX-2 sin afectar a su expresión (Beharka y cols., 2001; Wu y cols., 2005) debido a la disminución de ONOO^- , que puede actuar como un importante cofactor para la actividad de COX. De acuerdo con estos estudios, observamos una disminución en la producción del metabolito de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en el medio de incubación de arterias de animales hipertensos tratados con tempol. Además, NS 398, inhibidor selectivo de COX-2, que inhibió la liberación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en segmentos de aorta de ratas SHR sin tratar con tempol, no modificó la producción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en arterias de SHR tratadas con tempol, sugiriendo que el O_2^- podría ser responsable, al menos en parte, del aumento en la liberación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ observado con la hipertensión. El hecho de que un prostanoide contráctil como es $\text{PGF}_{2\alpha}$ disminuya y que 8-isoprostanos, que pueden inducir respuestas vasoconstrictoras a través del receptor TP, aumenten, puede explicar el hecho de que las respuestas netas a fenilefrina no se hayan modificado con el tratamiento de tempol. Li y cols. (2005) obtuvieron respuestas contráctiles a ácido araquidónico similares después del tratamiento con tempol en ratas diabéticas.

Los resultados expuestos en este apartado sugieren, por tanto, que el anión superóxido puede estar modificando la participación de prostanoide contráctiles derivados de COX-2, probablemente a través de una modificación en la actividad de dicha enzima. Sin embargo, son necesarios más abordajes experimentales para determinar el mecanismo implicado.

Conclusiones

1. La hipertensión incrementa ligeramente las respuestas vasculares a fenilefrina y disminuye las relajaciones endotelio-dependientes.

2. La hipertensión incrementa tanto la expresión como la formación endotelial de NO derivado de iNOS. Sin embargo, los efectos vasodilatadores de este mediador, se contrarrestan debido a la mayor producción de $O_2^{\cdot -}$ que se observa también en aorta de ratas hipertensas.

3. Con la hipertensión se produce un incremento en la producción de $O_2^{\cdot -}$ a partir de la NAD(P)H oxidasa, que participa en la regulación de la contracción a fenilefrina únicamente en aorta de ratas hipertensas. El H_2O_2 no participa en la respuesta contráctil inducida por fenilefrina ni en segmentos de ratas normotensas ni en segmentos de ratas hipertensas.

4. Prostanoides contráctiles derivados de COX-2 modulan la contracción inducida por fenilefrina. Estos prostanoides son diferentes del TXA_2 ; sin embargo, median su acción a través de la unión al receptor TP.

5. La COX-2 expresada en el endotelio, es la responsable de la síntesis de los prostanoides que participan en la respuesta contráctil inducida por fenilefrina. Sin embargo, la COX-2 se expresa también en fibroblastos y otras células de la adventicia.

6. Con la la hipertensión se produce un aumento en la expresión vascular de la COX-2, un aumento en la formación de prostanoides contráctiles a partir de esta isoforma y una mayor participación de los mismos en la respuesta inducida por fenilefrina.

Conclusiones

7. La Angiotensina II, a través de la activación del receptor AT₁, participa en el aumento en la expresión vascular de COX-2, en la mayor producción de prostanoïdes contráctiles a partir de esta isoforma y en el incremento en la participación de los mismos en la respuesta contráctil inducida por fenilefrina, observados con la hipertensión.

8. La hipertensión se asocia a un incremento de estrés oxidativo, que mejora tras el tratamiento con losartán, implicando así a la AngII en el desarrollo del mismo durante la hipertensión.

9. La producción de aniones superóxido interviene también en la mayor participación de prostanoïdes contráctiles derivados de COX-2 en la respuesta contráctiles, observada con la hipertensión, puesto que se reduce con el tratamiento de los animales con el análogo de la superóxido dismutasa, tempol.

Bibliografia

- Abdel-Latif AA. Cross talk between cyclic nucleotides and polyphosphoinositide hydrolysis, protein kinases, and contraction in smooth muscle. *Exp Biol Med*. 2001. 226:153–163
- Adeagbo ASO, Zhang X, Patel D, Joshua IG, Wang Y, Sun X, Igbo IN, Oriowo MA. Cyclo-oxygenase-2, endothelium and aortic reactivity during deoxycorticosterone acetate salt-induced hypertension. *J Hypertens*. 2005. 23:1025–1036
- Adeagbo ASO, Joshua IG, Falkner C, Matheson PJ. Tempol, an antioxidant, restores endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated vasodilation during hypertension. *Eur J Pharmacol*. 2003. 481:91–100
- Akpononu BE, Mulrow PJ, Hoffman EA. Secondary hypertension: evaluation and treatment. *Dis Mon*. 1996. 42:609–722
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001. 357:593–615
- Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am J Hypertens*. 2000. 13:31S–38S
- Alonso MJ, Rodríguez-Martínez MA, Martínez-Orgado J, Marín J, Salaices M. The L-arginine inhibition of rat middle cerebral artery contractile responses is mediated by inducible nitric oxide synthase. *J Auton Pharmacol*. 1998. 18:105–113
- Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res*. 1999. 43:521–531
- Bader M, Peters J, Baltatu O, Muller DN, Luft FC, Ganten D. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med*. 2001. 79:76–102
- Barnes PJ, Karin M. Mechanisms of Disease: Nuclear Factor- κ B — A Pivotal Transcription Factor in Chronic Inflammatory Diseases. *N Engl J Med*. 1997. 336:1066–1071
- Bauersachs J, Bouloumie A, Mulsch A, Wiemer G, Fleming I, Busse R. Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rats: changes in NO synthase III and soluble guanylyl cyclase expression, and in superoxide anion production. *Cardiovasc Res*. 1998. 37:772–779
- Beharka AA, Wu D, Serafini M, Meydani SN. Mechanism of vitamin E inhibition of cyclooxygenase activity in macrophages from old mice: role of peroxynitrite. *Free Radic Biol Med*. 2002. 32:503–511

- Belik J, Jankov RP, Pan J, Tanswell AK. Peroxynitrite inhibits relaxation and induces pulmonary artery muscle contraction in the newborn rat. *Free Radic Biol Med*. 2004. 37:1384-1392
- Beltowski J, Wójcicka G, Jamroz-Wisniewska A, Borkowska E, Marciniak A. Antioxidant treatment normalizes nitric oxide production, renal sodium handling and blood pressure in experimental hyperleptinemia. *Life Sci*. 2005. 77:1855-1868
- Beswick RA, Zhang H, Marable D, Catravas JD, Hill WD, Webb RC. Long-term antioxidant administration attenuates mineralocorticoid hypertension and renal inflammatory response. *Hypertension*. 2001. 37:781-786
- Bishop-Bailey D, Hla T, Mitchell JA. Cyclo-oxygenase-2 in vascular smooth muscle. *Int J Molec Med*. 1999. 3:41-48
- Bishop-Bailey D, Larkin SW, Warner TD, Chen G, Mitchell JA. Characterization of the induction of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase in rat aorta in organ culture. *Br J Pharmacol*. 1997. 121:125-133
- Blanco-Rivero J, Cachafeiro V, Lahera V, Aras-Lopez R, Marquez-Rodas I, Salaices M, Xavier FE, Ferrer M, Balfagon G. Participation of prostacyclin in endothelial dysfunction induced by aldosterone in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*. 2005. 46:107-112
- Boer R, Ulrich WR, Klein T, Mirau B, Haas S, Baur I. The inhibitory potency and selectivity of arginine substrate site nitric-oxide synthase inhibitors is solely determined by their affinity toward the different isoenzymes. *Mol Pharmacol*. 2000. 58:1026-1034
- Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*. 1994. 368:850-853
- Boloumie A, Bauersachs J, Linz W, Scholkens BA, Wiemer G, Fleming I, Busse R. Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production. *Hypertension*. 1997. 30:934-941
- Bomzon A, Huang YT. Vascular smooth muscle cell signaling in cirrhosis and portal hypertension. *Pharmacol Ther*. 2001. 89:255-272
- Boulanger CM, Heymes C, Benessiano J, Geske RS, Lèvy BI, Vanhoutte PM. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells. Activation by angiotensin II in hypertension. *Circ Res*. 1998. 83:1271-1278

- Brandes RP, Kreuzer J. Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc Res.* 2005. 65:16-27
- Briones AM, Alonso MJ, Hernanz R, Miguel M, Salaices M. Alterations of the nitric oxide pathway in cerebral arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002a. 39:378-388
- Briones AM, Alonso MJ, Hernanz R, Tovar S, Vila E, Salaices M. Hypertension alters the participation of contractile prostanoids and superoxide anions in lipopolysaccharide effects on small mesenteric arteries. *Life Sci.* 2002b. 71:1997-2014
- Briones AM, Alonso MJ, Marín J, Balfagón G, Salaices M. Influence of hypertension on nitric oxide synthase expression and vascular effects of lipopolysaccharide in rat mesenteric arteries. *Br J Pharmacol.* 2000. 131:185-194
- Briones AM, Salaices M, Vila E. Ageing alters the production of nitric oxide and prostanoids after IL-1 β exposure in mesenteric resistance arteries. *Mech Ageing Dev.* 2005. 126:710-721
- Bryan RM, You J, Golding EM, Marrelli SP. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a cousin to nitric oxide and prostacyclin. *Anesthesiology.* 2005. 102:1261-1277
- Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular disease. The role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000. 87:840-844
- Cai H, Griending KK, Harrison DG. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2003. 24:471-478
- Camacho M, López-Belmonte J, Vila L. Rate of vasoconstrictor prostanoids released by endothelial cells depends on cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin I synthase activity. *Circ Res.* 1998. 83:353-365
- Carretero OA, Oparil S. Essential hypertension. Part I: Definition and etiology. *Circulation.* 2000. 101: 329-335
- Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. Molecular of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol.* 2000. 184:409-420
- Chamorro V, Wangensteen R, Sainz J, Duarte J, O'Valle F, Osuna A, Vargas F. Protective effects of the angiotensin II type 1 (AT1) receptor blockade in low-renin deoxycorticosterone acetate (DOCA)-treated spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci.* 2004. 106:251-259

- Charette L, Misquitta C, Guay J, Riendeau D, Jones TR. Involvement of cyclooxygenase 2 (COX-2) in intrinsic tone of isolated guinea pig trachea. *Can J Physiol Pharmacol*. 1995. 73:1561-1567
- Chen G, Suzuki H, Weston AH. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br J Pharmacol*. 1988. 95:1165-1174
- Chen X, Touyz RM, Park JB, Schiffrin EL. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension*. 2001. 38:606-611
- Chen YF, Cowley AW, Zou AP. Increased H₂O₂ counteracts the vasodilator and natriuretic effects of superoxide dismutation by tempol in renal medulla. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003. 285:R827-R833
- Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Grosser T, Lawson JA, FitzGerald GA. Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A₂. *Science*. 2002. 296:474-475
- Cheng ZJ, Vapaatalo H, Mervaala E. Angiotensin II and vascular inflammation. *Med Sci Monit*. 2005. 11:RA194-205
- Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ; Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *JAMA*. 2003. 289:2560-2572
- Chou TC, Yen MH, Li CY, Ding YA. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension*. 1998. 31:643-648
- Chu Y, Iida S, Lund DD, Weiss RM, DiBona GF, Watanabe Y, Faraci FM, Heistad DD. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase reduces arterial pressure in spontaneously hypertensive rats: role of heparin-binding domain. *Circ Res*. 2003. 92:461-468
- Connolly C, McCormick PA, Docherty JR. Effects of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide on vascular contractions in endothelium-denuded rat aorta. *Eur J Pharmacol*. 1998. 352:53-48
- Cosentino F, Eto M, De Paolis P, Van der Loo B, Bachschmid M, Ullrich V, Kouroedov A, Delli Gatti C, Joch H, Volpe M, Luscher

- TF. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation*. 2003. 25:1017-1023
- Courtois E, Marques M, Barrientos A, Casado S, Lopez-Farre A. Lead-induced downregulation of soluble guanylate cyclase in isolated rat aortic segments mediated by reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. *J Am Soc Nephrol*. 2003. 14:1464-1470
- Cox RH. Changes in the expression and function of arterial potassium channels during hypertension. *Vasc Pharmacol*. 2002. 38:13-23
- Cracowski JL, Devillier P, Durand T, Stanke-Labesque F, Bessard G. Vascular biology of the isoprostanes. *J Vasc Res*. 2001. 38:93-103
- Cruzado MC, Risler NR, Miatello RM, Yao G, Schiffrin EL, Touyz RM. Vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase activity during the development of hypertension: Effect of angiotensin II and role of insulinlike growth factor-1 receptor transactivation. *Am J Hypertens*. 2005. 18:81-87
- Dantas APV, Scivoletto R, Fortes ZB, Nigro D, Carvalho MHC. Influence of female sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1999. 34:914-919
- Darley-USmar V, Halliwell B. Blood Radicals. Reactive Nitrogen Species, Reactive Oxygen Species, Transition Metal Ions, and the Vascular System. *Pharm Res*. 1996. 13:649-657
- Das UN. Is angiotensin-II an endogenous pro-inflammatory molecule? *Med Sci Monit*. 2005. 11:RA155-162
- Davidge ST. Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circ Res*. 2001. 89:650-660
- Dellipizzi A, Pucci ML, Mosny AY, Deseyn K, Nasjletti A. Contribution of constrictor prostanoids to the calcium-dependent basal tone in the aorta from rats with aortic coarctation-induced hypertension: relationship to nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997. 283:75-81
- Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Hypertension*. 2000. 18:655-673
- Didion SP, Faraci FM. Effects of NADH and NADPH on superoxide levels and cerebral vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002. 282:H688-H695

- Digiesi V, Oliviero C, Gianno V, Rossetti M, Fiorillo C, Oradei A, Lenuzza M, Nassi P. Reactive metabolites of oxygen, lipid peroxidation, total antioxidant capacity and vitamin E in essential arterial hypertension. *Clin Ter.* 1997. 148:515-519
- Dohi Y, Kojima M, Sato K. Endothelial modulation of contractile responses in arteries from hypertensive rats. *Hypertension.* 1996. 28:732-737
- Donmez G, Derici U, Erbas D, Arinsoy T, Onk A, Sindel S, Hasanoglu E. The effects of losartan and enalapril therapies on the levels of nitric oxide, malondialdehyde, and glutathione in patients with essential hypertension. *Jpn J Physiol.* 2002. 52:435-440
- Dorn GW, Becker MW, Davis MG. Dissociation of the contractile and hypertrophic effects of vasoconstrictor prostanoids in vascular smooth muscle. *J Biol Chem.* 1992. 267:24897-24905
- Dowell FJ, Martin W, Dominiczak AF, Hamilton CA. Decrease basal despite enhanced agonist-stimulated effects of nitric oxide in 12-week-old stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 1999. 379:175-182
- Duarte J, Pérez-Palencia R, Vargas F, Ocete MA, Pérez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Tamargo J. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 2001. 133:117-124
- Esteban V, Lorenzo O, Rupérez M, Suzuki Y, Mezzano S, Blanco J, Kretzler M, Sugaya T, Egido J, Ruiz-Ortega M. Angiotensin II, via AT1 and AT2 receptors and NF-kappaB pathway, regulates the inflammatory response in unilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol.* 2004. 15:1514-1529
- Esteban V, Rupérez M, Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Lorenzo O, Demaegdt H, Vanderheyden P, Egido J, Ruiz-Ortega M. Angiotensin IV activates the nuclear transcription factor-kappaB and related proinflammatory genes in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2005. 96:965-973
- Fang X, Chen P, Moore SA. The oxygen radical scavenger pyrrolidine dithiocarbamate enhances interleukin-1beta-induced cyclooxygenase-2 expression in cerebral microvascular smooth muscle cells. *Microvasc Res.* 2002. 64:405-413
- Feng L, Xia Y, Garcia GE, Hwang D, Wilson CB. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide. *J Clin Invest.* 1995. 95:1669-1675

- Ferreira AJ, Santos RAS. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res.* 2005. 38:499-507
- Ferrer M., Sánchez M., Minoves N., Salaices M., Balfagón G. Aging increases neuronal nitric oxide release and superoxide anion generation in mesenteric arteries spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res.* 2003. 40:509-519
- Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Griendling KK, Harrison DG. Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension. *Circ Res.* 1999. 85:23-28
- Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. *Science.* 2001. 294:1871-1875
- Gao Y, Ye LH, Kishi H, Okagaki T, Samizo K, Nakamura A, Kohama K. Myosin light chain kinase as a multifunctional regulatory protein of smooth muscle contraction. *IUBMB Life.* 2001. 51:337-344
- Gao YJ, Hirota S, Zhang DW, Janssen LJ, Lee RM. Mechanisms of hydrogen-peroxide-induced biphasic response in rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol.* 2003. 138:1085-1092
- Gao YJ, Lee RM. Hydrogen peroxide induces a greater contraction in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats through thromboxane A(2) production. *Br J Pharmacol.* 2001. 134:1639-1646
- Gao YJ, Lee RMKW. Hydrogen peroxide is an endothelium-dependent contracting factor in rat renal artery. *Br J Pharmacol.* 2005. 146:1061-1068
- García-Cohen EC, Marín J, Díez-Picazo LD, Baena AB, Salaices M, Rodríguez-Martínez MA. Oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide causes vasoconstriction in the aorta from hypertensive and aged rats: role of cyclooxygenase-2 isoform. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000. 293:75-81
- Ge T, Hughes H, Junquero DC, Wu KK, Vanhoutte PM, Boulanger CM. Endothelium-dependent contractions are associated with both augmented expression of prostaglandin H synthase-1 and hypersensitivity to prostaglandin H₂ in the SHR aorta. *Circ Res.* 1995. 76:1003-1010
- Ghosh M, Wang HD, McNeill JR. Role of oxidative stress and nitric oxide in regulation of spontaneous tone in aorta of DOCA-salt hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 2004. 141:562-573

- Gil-Longo J, Gonzalez-Vazquez C. Characterization of four different effects elicited by H₂O₂ in rat aorta. *Vasc Pharmacol*. 2005. 43:128-138
- Girouard H, de Champlain J. Inhibitory effect of melatonin on alpha1-adrenergic-induced vasoconstriction in mesenteric beds of spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 2004. 17:339-346
- González MC, Arribas SM, Molero F, Fernández-Alfonso MS. Effect of removal of adventitia on vascular smooth muscle contraction and relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001. 280:H2876-H2881
- Griendling KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000a. 20:2175-2183
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase. Role in Cardiovascular Biology and Disease. *Circ Res*. 2000b. 86:494-501
- Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1994. 74:1141-1148
- Hamilton CA, Brosnan MJ, McIntyre M, Graham D, Dominiczack AF. Superoxide excess in hypertension and aging. *Hypertension*. 2001. 37:529-534
- Harris RC, Zhang MZ, Cheng HF. Cyclooxygenase-2 and the renal renin-angiotensin system. *Acta Physiol Scand*. 2004. 181:543-547
- Hayabuchi Y, Nakaya Y, Matsuoka S, Kuroda Y. Hydrogen peroxide-induced vascular relaxation in porcine coronary arteries is mediated by Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Heart Vessels*. 1998. 13:9-17
- Hector-Polizio A, Peña C. Effects of angiotensin II type 1 receptor blockade on the oxidative stress in spontaneously hypertensive rat tissues. *Regul Pept*. 2005. 128:1-5
- Henrion D, Dechaux E, Dowell FJ, MacIour J, Samuel JL, Levy BI, Michel JB. Alteration of flow-induced dilatation in mesenteric resistance arteries of L-NAME treated rats and its partial association with induction of cyclo-oxygenase-2. *Br J Pharmacol*. 1997. 121:83-90

- Hernández J, Astudillo H, Escalante B. Angiotensin II stimulates cyclooxygenase-2 mRNA expression in renal tissue from rats with kidney failure. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002. 282:F592-F598
- Hernanz R, Alonso MJ, Briones AM, Vila E, Simonsen U, Salaices M. Mechanisms involved in the early increase of serotonin contraction evoked by endotoxin in rat middle cerebral arteries. *Br J Pharmacol*. 2003. 140:671-680
- Hibino M, Okumura K, Iwama Y, Mokuno S, Osanai H, Matsui H, Toki Y, Ito T. Oxygen-derived free radical-induced vasoconstriction by thromboxane A2 in aorta of the spontaneously hypertensive rat. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999. 33:605-610
- Hinglais N, Heudes D, Nicoletti A, Mandet C, Laurent M, Bariety J, Michel JB. Colocalization of myocardial fibrosis and inflammatory cells in rats. *Lab Invest*. 1994. 70:286-294
- Hoehrl K, Wolf K, Castrop H, Ittner KP, Bucher M, Kees F, Grobecker HF, Kurtz A. Renocortical expression of renin and of cyclooxygenase-2 in response to angiotensin II AT1 receptor blockade is closely coordinated but not causally linked. *Pflugers Arch*. 2001. 442:821-827
- Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent Progress in Angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension*. 1999. 33:613-621
- Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev*. 1996. 76:967-1002
- Hu ZW, Kerb R, Shi XY, Wei-Lavery T, Hoffman BB. Angiotensin II increases expression of cyclooxygenase-2: implications for the function of vascular smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002. 303:563-573
- Hutri-Kähönen N, Kähönen M, Wu X, Sand J, Nordback I, Taurio J, Porsti I. Control of vascular tone in isolated mesenteric arterial segments from hypertensive patients. *Br J Pharmacol*. 1999. 127:1735-1743
- Ishizaka N, Griendling KK, Lassegue B, Alexander RW. Angiotensin II type 1 receptor: relationship with caveolae and caveolin after initial agonist stimulation. *Hypertension*. 1998. 32:459-466
- Jaimes EA, Tian RX, Pearse D, Raij L. Up-regulation of glomerular COX-2 by angiotensin II: role of reactive oxygen species. *Kidney Int*. 2005. 68:2143-2153
- Jiang B, Xu S, Hou X, Pimentel DR, Cohen RA. Angiotensin II differentially regulates interleukin-1-beta-inducible NO synthase

- (iNOS) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression: role of p38 MAPK. *J Biol Chem.* 2004. 279:20363-20368
- Jourdan KB, Mitchell JA, Evans TW. Release of isoprostanes by human pulmonary artery in organ culture: a cyclo-oxygenase and nitric oxide dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997. 233:668-672
- Kabe Y, Ando K, Hirao S, Yoshida M, Handa H. Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antioxid Redox Signal.* 2005. 7:395-403
- Kagota S, Tamashiro A, Yamaguchi Y, Nakamura K, Kunitomo M. High salt intake impairs vascular nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate system in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002. 302:344-351
- Kaschina E, Unger T. Angiotensin AT1/AT2 Receptors: Regulation, Signalling and Function. *Blood Press.* 2003. 12:70-88
- Kerr S, Brosnan MJ, McIntyre M, Reid JL, Dominiczak AF, Hamilton CA. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium. *Hypertension.* 1999. 33:1353-1358
- Kiarash A, Pagano PJ, Tayeh M, Rhaleb NE, Carretero OA. Upregulated expression of rat heart intercellular adhesion molecule-1 in angiotensin II- but not phenylephrine- induced hypertension. *Hypertension.* 2001. 37:58-65
- Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev.* 2000. 52:11-34
- Kiritoshi S, Nishikawa T, Sonoda K, Kukidome D, Senokuchi T, Matsuo T, Matsumura T, Tokunaga H, Brownlee M, Araki E. Reactive oxygen species from mitochondria induce cyclooxygenase-2 gene expression in human mesangial cells: potential role in diabetic nephropathy. *Diabetes.* 2003. 52:2570-2577
- Klein T, Neuhaus K, Reutter F, Nusing RM. Generation of 8-epi-prostaglandin F(2alpha) in isolated rat kidney glomeruli by a radical-independent mechanism. *Br J Pharmacol.* 2001. 133:643-650

- Klein T, Reutter F, Schweer H, Seyberth HW, Nüsing RM. Generation of the isoprostane 8-epi-prostaglandin F2 α in vitro and in vivo via cyclooxygenases. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997. 282:1658-1665
- Klein T, Neuhaus K, Reutter F, Nüsing RM. Generation of 8-epi-prostaglandin F2 α in isolated rat kidney glomeruli by a radical-independent mechanism. *Br J Pharmacol*. 2001. 133:643-650
- Knowles RG, Salter M, Brooks SL, Moncada S. Anti-inflammatory glucocorticoids inhibit the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung, liver and aorta of the rat. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990. 172:1042-1048
- Koller A, Bagi Z. Nitric oxide and H₂O₂ contribute to reactive dilation of isolated coronary arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004. 287:H2461-H2467
- Kromer BM, Tippins JR. Actions of 8 epi prostaglandin F2 α on isolated rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998. 32:471-478
- Küng CF, Lüscher TF. Different mechanisms of endothelial dysfunction with aging and hypertension in rat aorta. *Hypertension*. 1995. 25:194-200
- Lacy F, O'Connor DT, Schmid-Schonbein GW. Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *J Hypertens*. 1998. 16:291-303
- Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*. 2003. 111:1201-1209
- Laviades C, Varo N, Fernández J, Mayor G, Gil MJ, Monreal I, Díez J. Abnormalities of the extracellular degradation of collagen type I in essential hypertension. *Circulation*. 1998. 11:535-540
- Lavoie JL, Sigmund CD. Minireview: Overview of the renin-angiotensin system- an endocrine and paracrine system. *Endocrinology*. 2003. 144:2179-2183
- Lenzen H, Tsikas D, Boger RH. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and the risk for coronary heart disease: the multicenter CARDIAC study. *Eur J Clin Pharmacol*. 2006. 13:45-49
- Li H, Förstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol*. 2000. 190:244-254

- Li J, Chen YJ, Quilley J. Effect of tempol on renal cyclooxygenase expression and activity in experimental diabetes in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005. 314:818-824
- Li J, Li W, Liu W, Altura BT, Altura BM. Mechanisms of hydroxyl radical-induced contraction of rat aorta. *Eur J Pharmacol*. 2004. 19:171-178
- Lin L, Balazy M, Pagano PJ, Nasjletti A. Expression of prostaglandin H₂-mediated mechanism of vascular contraction in hypertensive rats. *Circ Res*. 1994. 74:197-205
- Lin L, Nasjletti A. Prostanoid-mediated vascular contraction in normotensive and hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*. 1992. 220:49-53
- Lincoln TM, Dey N, Sellak H. Signal Transduction in Smooth Muscle. Invited Review. cGMP-dependent protein kinase signalling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol* 2001. 91:1421-1430
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*. 2001. 25:402-408
- Lombardi DM, Viswanathan M, Vio CP, Saavedra JM, Schwartz SM, Johnson RJ. Renal and vascular injury induced by exogenous angiotensin II is AT₁ receptor-dependent. *Nephron*. 2001. 87:66-74
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Lewis Farr A, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951. 193:265-275
- Lu Y, Wahl LM. Oxidative stress augments the production of matrix metalloproteinase-1, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E₂ through enhancement of NF-kappa B activity in lipopolysaccharide-activated human primary monocytes. *J Immunol*. 2005. 175:5423-5429
- Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldm SA. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev*. 2000. 52:375-414
- Lumbers E.R. Angiotensin and aldosterone. *Regul Pept*. 1999. 80:91-100
- Lüscher TF, Aarhus LL, Vanhoutte PM. Indomethacin improves the impaired endothelium-dependent relaxation in small mesenteric arteries of the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens*. 1990. 3:55-58

- Lüscher TF, Diederich D, Weber E, Vanhoutte PM, Bühler FR. Endothelium-dependent responses in carotid and renal arteries of normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*. 1988. 11:573-578
- Maffei A, Poulet R, Vecchione C, Colella S, Fratta L, Frati G, Trimarco V, Trimarco B, Lembo G. Increased basal nitric oxide release despite enhanced free radical production in hypertension. *J Hypertens*. 2002. 20:1135-1142
- Manning RD Jr, Tian N, Meng S. Oxidative stress and antioxidant treatment in hypertension and the associated renal damage. *Am J Nephrol*. 2005. 25:311-317
- Mantle D, Patel VB, Why HJ, Ahmed S, Rahman I, MacNee W, Wassif WS, Richardson PJ, Preedy VR. Effects of lisinopril and amlodipine on antioxidant status in experimental hypertension. *Clin Chim Acta*. 2000. 299:1-10
- Manucha W, Oliveros L, Carrizo L, Seltzer A, Valles P. Losartan modulation on NOS isoforms and COX-2 expression in early renal fibrogenesis in unilateral obstruction. *Kidney Int*. 2004. 65:2091-2107
- Marín J, Rodríguez-Martínez MA. Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. *J Auton Pharmacol*. 1995. 15:279-307
- Marín J, Rodríguez-Martínez MA. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol Ther*. 1997. 75:111-134
- Marín J. Mechanisms involved in the increased vascular resistance in hypertension. *J Auton Pharmacol*. 1993. 13:127-176
- Mark KS, Trickler WJ, Miller DW. Tumor necrosis factor- α induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin release in brain microvessel endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001. 297:1051-1058
- Marquer-Domagala FL, Finet M. Comparison of the nitric oxide and cyclo-oxygenase pathway in mesenteric resistance vessels of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. 1997. 121:588-594
- Martínez J, Sánchez T, Moreno JJ. Regulation of prostaglandin E2 production by the superoxide radical and nitric oxide in mouse peritoneal macrophages. *Free Radic Res*. 2000. 32:303-311
- Mervaala EM, Cheng ZJ, Tikkanen I, Lapatto R, Nurminen K, Vapaatalo H, Müller DN, Fiebeler A, Ganten U, Ganten D, Luft FC. Endothelial

- dysfunction and xanthine oxidoreductase activity in rats with human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension*. 2001. 37:414-418
- Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M, Guttermann DD. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circ Res*. 2003. 7:e31-e40
- Moreno JM, Rodríguez Gómez I, Wangenstein R, Osuna A, Bueno P, Vargas F. Cardiac and renal antioxidant enzymes and effects of tempol in hyperthyroid rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005. 289:E776-E783
- Müller DN, Dechend R, Mervaala EM, Park JK, Schmidt F, Fiebeler A, Theuer J, Breu V, Ganten D, Haller H, Luft FC. NF- κ B inhibition ameliorates angiotensin II-induced inflammatory damage in rats. *Hypertension*. 2000. 35:193-201
- Mulvany MJ. Abnormalities of the resistance vasculature in hypertension: correction by vasodilator therapy. *Pharmacol Rep*. 2005. 57:144-150
- Mulvany MJ. Small artery remodelling in hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2002. 4:49-55
- Nakano D, Itoh C, Ishii F, Kawanishi H, Takaoka M, Kiso Y, Tsuruika N, Tanaka T, Matsumura Y. Effects of sesamin on aortic oxidative stress and endothelial dysfunction in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Biol Pharm Bull*. 2003. 26:1701-1705
- Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med*. 2005. 26:33-65
- Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest*. 1997. 100:2417-2423
- Newaz MA, Yousefipour Z, Nawal NN. Modulation of nitric oxide synthase activity in brain, liver, and blood vessels of spontaneously hypertensive rats by ascorbic acid: protection from free radical injury. *Clin Exp Hypertens*. 2005. 27:497-508
- Nielsen KC, Owman C. Contractile response and amine receptor mechanism in isolated middle cerebral artery of the cat. *Brain Res*. 1971. 27:633-642
- Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*. 2001. 31:1287-1312
- O'Brien AJ, Wilson AJ, Sibbald R, Singer M, Clapp LH. Temporal variation in endotoxin-induced vascular hyporeactivity in a rat

- mesenteric artery organ culture model. *Br J Pharmacol*. 2001. 133:351-360
- Ohnaka K, Numaguchi K, Yamakawa T, Inagami T. Induction of cyclooxygenase-2 by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 2000. 35:68-75
- Otsuka S, Sugano M, Makino N, Sawada S, Hata T, Niho Y. Interaction of mRNAs for angiotensin II type 1 and type 2 receptors to vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1998. 32:467-472
- Papapetropoulos A, Rudic RD, Sessa WC. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 1999. 43:509-520
- Park JB, Touyz RM, Chen X, Schiffrin EL. Chronic treatment with a superoxide dismutase mimetic prevents vascular remodeling and progression of hypertension in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 2002. 15:78-84
- Pauletto P, Rattazzi M. Inflammation and hypertension: the search for a link. *Nephrol Dial Transplant*. 2006. 21:850-853
- Pratico D, FitzGerald GA. Generation of 8-epiprostaglandin F2alpha by human monocytes. Discriminate production by reactive oxygen species and prostaglandin endoperoxide synthase-2. *J Biol Chem*. 1996. 271:8919-8924
- Preti SC, da Cunha V, Vasallo DV, Stefanon I. The Superoxide Dismutase Mimetic, Tempol, reduces the bioavailability of nitric oxide and does not alter L-NAME-induced hypertension in rats. *Pharmacol Toxicol*. 2005. 97:29:34
- Pueyo ME, González W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF, Michel JB. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000. 20:645-651
- Pueyo ME, Michel JB. Angiotensin II receptors in endothelial cell. *Gen Pharmac*. 1997. 29:691-696
- Püntmann VO, Hussain MB, Mayr M, Xu Q, Singer DR. Role of oxidative stress in angiotensin-II mediated contraction of human conduit arteries in patients with cardiovascular disease. *Vasc Pharmacol*. 2005. 43:277-282
- Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat

Bibliografía

- increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest.* 1996. 97:1916–1923
- Ramsay RG, Ciznadija D, Vanevski M, Mantamadiotis T. Transcriptional regulation of cyclo-oxygenase expression: three pillars of control. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2003. 16:59–67
- Rapoport RM, Williams SP. Role of prostaglandins in acetylcholine-induced contraction of aorta from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Hypertension.* 1996. 28:64–75
- Ray R, Shah AM. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin Sci.* 2005. 109:217–226
- Rebsamen MC, Capoccia R, Vallotton MB, Lang U. Role of cyclooxygenase 2, p38 and p42/44 MAPK in the secretion of prostacyclin induced by epidermal growth factor, endothelin-1 and angiotensin II in rat ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2003. 35:81–89
- Redón J, Oliva MR, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A, Saez GT. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension.* 2003. 41:1096–1101
- Rees DD, Cellek S, Palmer RM, Moncada S. Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone: an insight into endotoxin shock. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990. 173:541–547
- Rocha R, Martin-Berger CL, Yang P, Scherrer R, Delyani J, McMahon E. Selective aldosterone blockade prevents angiotensin II/salt-induced vascular inflammation in the rat heart. *Endocrinology.* 2002. 143:4828–4836
- Rodríguez-Iturbe B, Ferrebuz A, Vanegas V, Quiroz Y, Mezzano S, Vaziri ND. Early and sustained inhibition of nuclear factor- κ B prevents hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005. 315:51–57
- Rodríguez-Martínez MA, García-Cohen EC, Baena AB, González R, Salaices M, Marín J. Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endotelial modulation and mechanism involved. *Br J Pharmacol.* 1998. 125:1329–1335
- Rodríguez-Martínez MA, Ruiz-Torres A. Homeostasis between lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in healthy human aging. *Mech Ageing Dev.* 1992. 66:213–222

- Rossoni LV, Salaices M, Marín J, Vassallo DV, Alonso MJ. Alterations in phenylephrine-induced contractions and the vascular expression of Na⁺,K⁺-ATPase in ouabain-induced hypertension. *Br J Pharmacol*. 2002a. 135:771-781
- Rossoni LV, Salaices M, Miguel M, Briones AM, Barker LA, Vassallo DV, Alonso MJ. Ouabain-induced hypertension is accompanied by increases in endothelial vasodilator factors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002b. 283:H2110-H2118
- Ruetten H, Zabel U, Linz W, Schmidt HHHW. Downregulation of soluble guanylyl cyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*. 1999. 85:534-541
- Ruiz-Ortega M, Esteban V, Rupérez M, Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Carvajal G, Egido J. Renal and vascular hypertension-induced inflammation: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006. 15:159-166
- Ruiz-Ortega M, Rupérez M, Esteban V, Egido J. Molecular mechanisms of angiotensin II-induced vascular injury. *Curr Hypertens Reports* 2003. 5:73-79
- Rupérez M, Ruiz-Ortega M, Esteban V, Lorenzo O, Mezzano S, Plaza JJ, Egido J. Angiotensin II increases connective tissue growth factor in the kidney. *Am J Pathol*. 2003. 163:1937-1947
- Savoia C, Schiffrin EL. Inflammation in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006. 15:152-158
- Schiffrin EL. Vascular endothelin in hypertension. *Vasc Pharmacol*. 2005. 43:19-29
- Schiffrin EL, Park JB, Pu Q. Effect of crossing over hypertensive patients from a beta-blocker to an angiotensin receptor antagonist on resistance artery structure and on endothelial function. *J Hypertens*. 2002. 20:71-78
- Schiffrin EL, Touyz RM. From bedside to bench to bedside: role of renin-angiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004. 287:H435-H446
- Schlaich MP, Parnell MM, Ahlers BA, Finch S, Marshall T, Zhang WZ, Kaye DM. Impaired L-arginine transport and endothelial function in hypertensive and genetically predisposed normotensive subjects. *Circulation*. 2004. 110:3680-3686
- Sekiguchi F, Yanamoto A, Sunano S. Superoxide dismutase reduces the impairment of endothelium-dependent relaxation in the

- spontaneously hypertensive rat aorta. *J Smooth Muscle Res.* 2004. 40:65-74
- Serrano M, Morte S, Alvarez V, Zugarramurdi P, Palacios M. El proceso inflamatorio de la enfermedad cardiovascular: nuevos marcadores. *An Sist Sanit Navar.* 2001. 24: 315-326
- Shen JZ, Zheng XF, Kwan CY. Differential contractile actions of reactive oxygen species on rat aorta: selective activation of ATP receptor by H₂O₂. *Life Sci.* 2000. 14:PL291-PL296
- Shokoji T, Nishiyama A, Fujisawa Y, Hitomi H, Kiyomoto H, Takahashi N, Kimura S, Kohno M, Abe Y. Renal sympathetic nerve responses to tempol in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2003. 41:266-273
- Sobey CG, Heistad DD, Faraci FM. Mechanisms of bradykinin-induced cerebral vasodilatation in rats. Evidence that reactive oxygen species activate K⁺ channels. *Stroke.* 1997. 28:2290-2295
- Soccio M, Toniato E, Evangelista V, Carluccio M, De Caterina R. Oxidative stress and cardiovascular risk: the role of vascular NAD(P)H oxidase and its genetic variants. *Eur J Clin Invest.* 2005. 35:305-314
- Souza HP, Laurindo FR, Ziegelstein RC, Berlowitz CO, Zweier JL. Vascular NAD(P)H oxidase is distinct from the phagocytic enzyme and modulates vascular reactivity control. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001. 280:H658-H667
- Spencer AG, Woods JW, Arakawa T, Singer II, Smith WL. Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J Biol Chem.* 1998. 273:9886-9893
- Srivastava P, Rajanikanth M, Raghavan SA, Dikshit M. Role of endogenous reactive oxygen derived species and cyclooxygenase mediators in 5-hydroxytryptamine-induced contractions in rat aorta: relationship to nitric oxide. *Pharmacol Res.* 2002. 45:375-382
- Stoclet JC, Muller B, György K, Andriantsiothaina R, Kleschyov AL. The inducible nitric oxide synthase in vascular and cardiac tissue. *Eur J Pharmacol.* 1999. 375:139-155
- Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, Esteban V, Egido J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003. 35:881-900
- Tabet F, Savoia C, Schiffrin EL, Touyz RM. Differential calcium regulation by hydrogen peroxide and superoxide in vascular

- smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004. 44:200-208
- Taddei S, Vanhoutte PM. Role of endothelium in endothelin-evoked contractions in the rat aorta. *Hypertension.* 1993. 21:9-15
- Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Cyclooxygenase inhibition restores nitric oxide activity in essential hypertension. *Hypertension.* 1997. 29:274-279
- Tanabe T, Tohnai N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002. 68-69:95-114
- Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature. Molecular and cellular mechanisms. *Hypertension.* 2003. 42:1075-1081
- Tesfamariam B. Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic Biol Med.* 1994. 16:383-391
- Tetsuka T, Baier LD, Morrison AR. Antioxidants inhibit interleukin-1-induced cyclooxygenase and nitric-oxide synthase expression in rat mesangial cells. Evidence for post-transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 1996. 17:11689-11693
- Thakali K, Demel SL, Fink GD, Watts SW. Endothelin-1-induced contraction in veins is independent of hydrogen peroxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005. 289:H1115-H1122
- Tomida T, Numaguchi Y, Nishimoto Y, Tsuzuki M, Hayashi Y, Imai H, Matsui H, Okumura K. Inhibition of COX-2 prevents hypertension and proteinuria associated with a decrease of 8-iso-PGF₂α formation in L-NAME-treated rats. *J Hypertens.* 2003. 21:601-609
- Tomioka H, Hattori Y, Fukao M, Sato A, Liu M, Sakuma I, Kitabatake A, Kanno M. Relaxation in different-sized rat blood vessels mediated by endothelium-derived hyperpolarizing factor: importance of processes mediating precontractions. *J Vasc Res.* 1999. 36:311-320
- Torrecillas G, Boyano-Adánez MC, Medina J, Parra T, Grier M, López-Ongil S, Arilla E, Rodríguez-Puyol M, Rodríguez-Puyol D. The role of hydrogen peroxide in the contractile response to angiotensin II. *Mol Pharmacol.* 2001. 59:104-112
- Tosaka M, Hashiba Y, Saito N, Imai H, Shimizu T, Sasaki T. Contractile responses to reactive oxygen species in the canine basilar artery in vitro: selective inhibitory effect of MCI-186, a

- new hydroxyl radical scavenger. *Acta Neurochir (Wien)*. 2002. 144:1305-1310
- Touyz RM. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells- implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res*. 2004a. 37:1263-1273
- Touyz RM. Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005. 14:125-131
- Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension*. 2004b. 44:248-252
- Touyz RM, Deng LY, He G, Wu XH, Schiffrin EL. Angiotensin II stimulates DNA and protein synthesis in vascular smooth muscle cells from human arteries: role of extracellular signal-regulated kinases. *J Hypertens*. 1999. 17:907-916
- Touyz RM, Schiffrin EL. Signal Transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev*. 2000. 52:639-672
- Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, Laursen JB, Hammes CP, Alexander RW, Harrison DG, Medford RM. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation*. 1999. 14:1223-1229
- Ulker S, McMaster D, McKeown PP, Bayraktutan U. Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation. *Cardiovasc Res*. 2003. 59:488-500
- Ungvari Z, Koller A. Endothelin and prostaglandin H₂/thromboxane A₂ enhance myogenic constriction in hypertension by increasing Ca²⁺ sensitivity of arteriolar smooth muscle. *Hypertension*. 2000. 36:856-861
- Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1998. 38:97-120
- Vanhoutte PM, Boulanger CM. Endothelium-dependent responses in hypertension. *Hypertens Res*. 1995. 18:87-98
- Vanhoutte PM, Feletou M, Taddei S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol*. 2005. 144:449-458

- Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F, Trnavsky-Hobbs DL. Effect of antioxidant therapy on blood pressure and NO synthase expression in hypertensive rats. *Hypertension*. 2000. 36:957-964
- Vaziri ND, Ni Z. Expression of NOX-I, gp91phox, p47phox and P67phox in the aorta segments above and below coarctation. *Biochim Biophys Acta*. 2005. 25:321-327
- Vaziri ND, Wang XQ, Oveisi F, Rad B. Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats. *Hypertension*. 2000. 36:142-146
- Vega GW, Roson MI, Bellver A, Celentano MM, de la Riva IJ. Nitric oxide and superoxide anions in vascular reactivity of renovascular hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens*. 1995. 17:817-835
- Virdis A, Schiffrin EL. Vascular inflammation: a role in vascular disease in hypertension? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2003. 12:181-187
- Viswanad B, Srinivasan K, Kaul CL, Ramarao P. Effect of tempol on altered angiotensin II and acetylcholine-mediated vascular responses in thoracic aorta isolated from rats with insulin resistance. *Pharmacol Res*. 2006. 53:209-125
- Von Knethen A, Callsen D, Brune B. Superoxide attenuates macrophage apoptosis by NF-kappa B and AP-1 activation that promotes cyclooxygenase-2 expression. *J Immunol*. 1999. 163:2858-2866
- Wagner RS, Weare C, Jin N, Mohler ER, Rhoades RA. Characterization of signal transduction events stimulated by 8-epi-prostaglandin(PG)F2 alpha in rat aortic rings. *Prostaglandins*. 1997. 54:581-599
- Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension*. 2004. 44:381-386
- Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ*. 2003. 27:201-206
- White LR, Juul R, Cappelen J, Aasly J. Cyclooxygenase inhibitors attenuate ET(B) receptor-mediated contraction in human temporal artery. *Eur J Pharmacol*. 2002. 448:51-57
- Widlansky ME, Price DT, Gokce N, Eberhardt RT, Duffy SJ, Holbrook M, Maxwell C, Palmisano J, Keaney JF Jr, Morrow JD, Vita JA. Short- and long- term COX-2 inhibition reverses endothelial

- dysfunction in patients with hypertension. *Hypertension*. 2003. 42:310-315
- Williams JM, Pollock JS, Pollock DM. Arterial pressure response to the antioxidant tempol and ETB receptor blockade in rats on a high-salt diet. *Hypertension*. 2004. 44:770-775
- Williams SP, Dorn GW, Rapoport RM. Prostaglandin I₂ mediates contraction and relaxation of vascular smooth muscle. *Am J Physiol*. 1994. 267:H796-H803
- Wolin MS. Interactions of oxidants with vascular signalling systems. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000. 20:1430-1442
- Wright DH, Abran D, Bhattacharya M, Hou X, Bernier SG, Bouayad A, Fouron JC, Vázquez-Tello A, Beauchamp MH, Clyman RI, Peri K, Varma DR, Chemtob S. Prostanoid receptor: ontogeny and implications in vascular physiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001. 281:R1343-R1360
- Wu CC, Hong HJ, Chou TZ, Ding YA, Yen MH. Evidence for inducible nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996. 228:459-466
- Wu D, Liu L, Meydani M, Meydani SN. Vitamin E increases production of vasodilator prostanoids in human aortic endothelial cells through opposing effects on cyclooxygenase-2 and phospholipase A2. *J Nutr*. 2005. 135:1847-1853
- Wu L, Wang R, de Champlain J. Enhanced inhibition by melatonin of alpha-adrenoceptor-induced aortic contraction and inositol phosphate production in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 1998. 16:339-347
- Wylam ME, Metkus AP, Umans JG. Nitric oxide dependent and independent effects of in vitro incubation or endotoxin on vascular reactivity in rat aorta. *Life Sci*. 2001. 69:455-467
- Xu H, Fink GD, Galligan JJ. Tempol lowers blood pressure and sympathetic nerve activity but not vascular O₂⁻ in DOCA-salt rats. *Hypertension*. 2004. 43:329-334
- Yamada M, Numaguchi Y, Okumura K, Harada M, Naruse K, Matsui H, Ito T, Hayakawa T. Prostacyclin synthase gene transfer modulates cyclooxygenase-2-derived prostanoid synthesis and inhibits neointimal formation in rat balloon-injured arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002. 22:256-262
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor

- peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988. 332:411-415
- Yanes L, Romero D, Iliescu R, Cucchiarelli VE, Fortepiani LA, Santacruz F, Bell W, Zhang H, Reckelhoff JF. Systemic arterial pressure response to two weeks of tempol therapy in SHR: involvement of NO, the RAS, and oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005. 288:R903-R908
- Young W, Mahboubi K, Haider A, Li I, Ferreri NR. Cyclooxygenase-2 is required for tumor necrosis factor- α - and angiotensin II-mediated proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 2000. 28:906-914
- Zalba G, Beaumont FJ, San José G, Fortuño A, Fortuño MA, Díez J. Is the balance between nitric oxide and superoxide anion in spontaneously hypertensive rats with endothelial dysfunction? *Nephrol Dial Transplant*. 2001. 16:2-5
- Zerrouk A, Auguet M, Chabrier PE. Augmented endothelium-dependent contraction to angiotensin II in the SHR aorta: role of an inducible cyclooxygenase metabolite. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998. 31:525-533
- Zerrouk A, Champeroux P, Safar M, Brisac AM. Role of endothelium in the endothelin-1-mediated potentiation of the norepinephrine response in the aorta of hypertensive rats. *J Hypertens*. 1997. 15:1101-1111
- Zhang Y, Jang R, Mori TA, Croft KD, Schyvens CG, McKenzie KU, Whitworth JA. The anti-oxidant tempol reverses and partially prevents adrenocorticotrophic hormone-induced hypertension in the rat. *J Hypertens*. 2003. 21:1513-1518
- Zhou MS, Jaimes EA, Raij L. Atorvastatin prevents end-organ injury in salt-sensitive hypertension: role of eNOS and oxidant stress. *Hypertension*. 2004. 44:186-190
- Zhou MS, Nishida Y, Chen QH, Kosaka H. Endothelium-derived contracting factor in carotid artery of hypertensive Dahl rats. *Hypertension*. 1999. 34:39-43

